

Experimentelle Untersuchungen über die
4-Amino-methylcyclohexancarbonsäure
(AMCHA)
als Antifibrinolyticum - Antiproteolyticum

von

EBERHARD SCHLINDWEIN

München 1965

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegl

Experimentelle Untersuchungen über die
4-Amino-methylcyclohexancarbonsäure (AMCHA)
als Antifibrinolyticum - Antiproteolyticum

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eberhard Schlindwein

aus

München

1965



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Marx

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schwiegk

Dekan: Prof. Dr. O. Hug

Tag der mündlichen Prüfung:

06. Juli 1965

Einleitung

1

1. Teil

2

Apparaturen- und Schulversuche

3

Methodik

10

Einleitung

9

Einleitung

11

Chemische Eigenschaften der Triphenylmethylverbindungen

12

Einleitung

16

Meinen lieben Eltern

Einleitung

14

Einleitung

15

Einleitung

16

Einleitung

17

Einleitung

18

Einleitung

19

Einleitung

20

Einleitung

21

Einleitung

22

Einleitung

23

Einleitung

24

Einleitung

25

Einleitung

26

Einleitung

27

Einleitung

28

Einleitung

29

Einleitung

30

Einleitung

31

Einleitung

32

Einleitung

33

Einleitung

34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
Einleitung	2
Literatur	3
Apparaturen und Substanzen	8
Methodik	10
Allgemeines	10
Ansätze	12
Thrombelastographische Fibrinolysebestimmung	13
Fehlerbreite	14
Versuche in vitro	21
Versuche mit Fibrinolytica	21
Hemmung der Streptokinasewirkung	22
Hemmung der Humanplasminwirkung (Plattentest)	25
Hemmung der Fibrinolyse durch Schweineplasmin	26
Hemmung der Plasminfibrinogenolyse	29
Versuche mit Proteolytica	34
Aktivierung von α -Chymotrypsin zu α -Chymotrypsin	
durch Trypsin und deren Hemmung:	34
Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin durch	
α -Chymotrypsin und deren Hemmung	37
Wirkung der Inhibitoren auf Trypsin	43
Wirkung der Inhibitoren auf α -Chymotrypsin	46
Einfluß der Inhibitoren auf die trypsin- und	
chymotrypsininduzierte Caseinolyse	49
α -Chymotrypsin CHOAY	50
Angriffspunkt des α -Chymotrypsin	53
Versuche in vivo	55
Diskussion	66
Zusammenfassung	70
Literaturverzeichnis	71

Einleitung:

Mit dem sich in den letzten Jahrzehnten immer mehr erweiternden Verständnis für die Biochemie der menschlichen Fermentsysteme wuchs auch die Erkenntnis, daß sich diese Fermente in einem sehr labilen Gleichgewicht befinden und daß schon kleinste Änderungen dieses Gleichgewichtes zu einer Ferment-"entgleisung" führen können. Wenn man heute "Teilentgleisungen" therapeutisch ausnutzt und gegebenenfalls aus Therapiegründen sogar herbeiführt, so muß man sich darüber im Klaren sein, daß man dabei große Risiken eingeht. So ist es verständlich, daß man sich nicht mehr mit Medikamenten zufrieden geben kann, die in der Lage sind, in diese Systeme einzugreifen, sondern jeweils auch ein sofort und lange Zeit wirkendes Antidot solcher Medikamente wünscht und fordert. Diese Antidote können gleichzeitig wieder als Therapeutica für pathologische Fermententgleisungen dienen.

Auf Anregung von R. MARX habe ich mich mit einigen Antidoten der Fibrinolyse, dem Kallikrein - Inaktivator, der epsilon - Amino - n - Capronsäure und der als Antidot bisher wenig bekannten 4 - Amino - Methyl - Cyclohexan - Carbonsäure-(1) beschäftigt.

In der vorliegenden Arbeit sollen in vitro, in vivo und im Thrombelastogramm

- 1) die antifibrinolytischen Eigenschaften dieser Inhibitoren überprüft und in ihrer Wirkung verglichen werden,
- 2) dabei auch versucht werden, die jeweiligen Angriffspunkte innerhalb des fibrinolytischen Systemes näher zu definieren und damit genauere Auskunft über ihren Wirkungsmechanismus zu erhalten,
- 3) Untersuchungen über die Aktivierung der Vorstufen der tryptischen Fermente zum aktiven Ferment und die Angriffsmöglichkeiten der Inhibitoren auf die Aktivierung und das aktive Ferment angestellt werden,

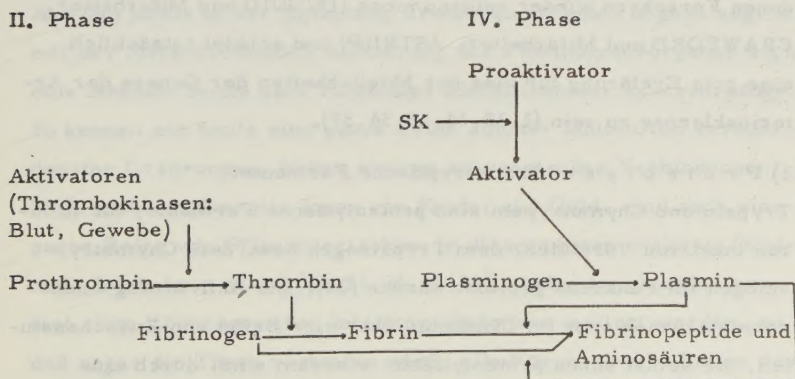
- 4) die Inaktivierung und Verweildauer der Inhibitoren in vivo bestimmt werden.

Literatur:

1) Fibrinolyse:

Die Fibrinolyse stellt die vierte Phase der Blutgerinnung dar (1, 16, 19). Sie ist in vitro und in vivo beobachtbar (2, 3, 16, 19). Sie ist mit der Bildung von Fibrin unter Mitwirkung des Thrombin verknüpft und weist erstaunliche Parallelitäten zur zweiten Phase der Gerinnung auf (2, 3, 16, 17, 19) (Schema 1). Sie wird durch Plasmin ausgelöst (2, 5, 26). Dieses liegt im Blut als inaktive Vorstufe, dem Plasminogen (Profibrinolysin) vor, das von einem Aktivator in Plasmin (Fibrinolysin) umgewandelt wird (2, 3, 5-7, 17, 38-41). Dieser Aktivator entsteht seinerseits aus einer inaktiven Vorstufe, einem Proaktivator, (3, 17, 38-41) und zwar unter der Katalyse zahlreicher, in der Therapie als sogenannten "indirekten" Fibrinolytika bekannten Lysokinasen. Diese sind teils körpereigen (Urokinase, Serokinase, Kinasen in der Milch, der Tränenflüssigkeit usw.), teils körperfremd (Streptokinase, Staphylokinase usw.) (2-4, 10, 29, 34).

Schema 1:



Plasmin spaltet Fibrin und Fibrinogen in Fibrinopeptide und Aminosäuren, die durch erneute Thrombinzugabe nicht mehr zur Gerinnung gebracht werden können (2, 18, 19, 34, 47).

Klinisch kennen wir Zustände gesteigerter und solche verminderter Fibrinolyse. Hyperfibrinolyse imponieren vor allem in der Chirurgie, der Geburtshilfe und Gynäkologie durch die mangelnde Möglichkeit eines Gefäßverschlusses durch Thromben, wodurch es zu profusen Blutungen kommen kann, die nur schwer zu beherrschen sind (23, 32, 52, 53). Diese Zustände können durch jede Art von Streß und durch die verschiedensten Toxine ausgelöst werden (42, 45, 50). Wir finden sie außerdem regelmäßig beim Schock (postoperativ !) und anoxämischen Zuständen (19). Hypofibrinolyse treten klinisch nicht so akut in Erscheinung. Sie gestatten aber dem Organismus, liegenbleibende Fibrinreste zu organisieren und spielen damit sicher bei der Genese von Verschwartungen und Briden nach serösen Entzündungen eine wichtige Rolle (2, 19). Neuerdings schenkt man hypofibrinolytischen Zuständen auch in der Arterioskleroseforschung vermehrt Beachtung. Die ROKITANSKY'sche Theorie, wonach Fibrinreste, die auf der Gefäßwand liegengeblieben sind, langsam von Endothel überwuchert werden und so schließlich in die Gefäßwand eingeschlossen werden, wurde von verschiedenen Forschern wieder aufgenommen (DUGUID und Mitarbeiter, CRAWFORD und Mitarbeiter, ASTRUP) und scheint tatsächlich eine gute Erklärung für eine der Möglichkeiten der Genese der Arteriosklerose zu sein (2, 12, 14, 15, 34, 37).

2) P r o t e o l y s e durch tryptische Fermente:

Trypsin und Chymotrypsin sind proteolytische Fermente, die in ihren inaktiven Vorstufen, dem Trypsinogen bzw. dem Chymotrypsinogen im Pankreas gebildet werden (24). Die Aktivierung findet normalerweise erst im Duodenum über eine Reihe von Zwischenstufen, die selbst schon proteolytisch wirksam sind, durch eine Peptidase statt (24). Aktives Trypsin wirkt dann autokatalytisch und katalysiert gleichzeitig die Chymotrypsinaktivierung. Trypsin

und Chymotrypsin sind Eiweißkörper, die ein Molekulargewicht von etwa 24.000 (kristallin) besitzen (19,24). Sie entwickeln ihre optimale Aktivität bei einem pH von 7,5 - 8,5. Trypsin greift an den Lysyl - Arginyl - bindungen der Peptidketten an, wobei es im Gegensatz zu Chymotrypsin und vielen anderen proteolytischen Fermenten auch die Ester und Amide spaltet. Chymotrypsin dagegen spaltet im Bereiche der aromatischen Gruppen der Peptidkette, also bei Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin. Native Proteine werden von beiden Fermenten schwerer angegriffen, als denaturierte, was nach KARLSON mit der Intaktheit der Sekundärstruktur zu erklären ist.

Eine Entgleisung dieses Fermentsystemes finden wir klinisch vor allem bei der Pancreatitis (11,28). Wenn sich auch in letzter Zeit die Kenntnis dieses Krankheitsbildes wesentlich erweitert und damit sich auch die Vorstellungen über ihre Genese gewandelt haben, so bleibt doch die Grundtatsache bestehen, daß es sich hierbei um eine tryptische Selbstverdauung von Pancreasgewebe handelt. Besonders gravierend wirkt sich dabei die Fähigkeit des Trypsins aus, die Umwandlung von Trypsinogen und Chymotrypsinogen in das aktive Ferment zu katalysieren.

3) I n h i b i t o r e n der Proteolyse und Fibrinolyse:

Aus den schon in der Einleitung erwähnten Gründen begann zugleich mit der fortschreitenden Aufklärung der Fibrinolysevorgänge auch eine lebhaftete Suche nach möglichen Inhibitoren der Lysisvorgänge. So kennen wir heute eine ganze Reihe solcher Inhibitoren verschiedensten Ursprunges. Neben einigen anorganischen Verbindungen (26), insbesondere den Ionen von Kupfer und Gold, sind auch eine ganze Reihe von Pflanzenextrakten in diesem Sinne wirksam (Erdnuß, Sojabohnen usw.) (23,33,34,46,54). Außerdem konnten aus fast allen Körpergeweben Inhibitorsubstanzen isoliert werden, so daß sogar die These vertreten wird, alle Körpergewebe hätten das gleiche fibrinolytische Potential, während die jeweils vorhandene

Inhibitorkonzentration variere, was dann einen unterschiedlichen Gehalt an Gewebsfibrinolysokinasen vortäusche (3,26). Erstaunlich an diesen Substanzen ist, daß ihnen teilweise eine relativ geringe Substratspezifität zukommt und sie damit auch gute Inhibitoren des Trypsins und Chymotrypsins sind.

Von diesen Inhibitoren ist der Kallikrein - Inaktivator aus Rinderorganen in breitem Umfang in die Therapie eingegangen. Er findet sich in einer Reihe von Organen (58) und ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 11.700 - 11.800. Neben seiner Hemmwirkung auf Trypsin und Chymotrypsin (43,55,58) besitzt er auch eine ausgeprägte Inhibitorwirkung gegenüber fibrinolytischen Fermenten (9,32,49,52). Er ist als Extrakt aus Rinderparotis unter dem Handelsnamen Trasylol (Bayer) im Verkehr (8, 13, 18, 30-34, 42, 43, 46, 51). Das Präparat ist nach KI (Kallikrein - Inaktivator) - E standardisiert, wobei 1 KI - E 4 γ kristalliner Substanz entsprechen.

Ein ähnlich breites Wirkungsspektrum kommt der epsilon - Amino - n - Capron - Säure, die im angloamerikanischen Schrifttum als ACA (epsilon - Amino - n - Capronic - Acid) bekannt ist, zu. Sie findet heute bei Hyperfibrinolyse die breiteste therapeutische Verwendung. Nach KUGEL (27) ist es empfehlenswert, sie grundsätzlich vor chirurgischen Eingriffen zu verabfolgen, um Blutungszwischenfälle zu vermeiden und postoperativ durch Vermeidung von Nachblutungen Blutkonserven zu sparen. Sie besitzt den Vorteil der peroralen Applikationsmöglichkeit bei sehr guter Verträglichkeit. Nach THOMAS und Mitarbeitern werden von der Ratte 500 mg freie Säure vertragen (57), während beim Kaninchen 1,5 g/kg subcutan die letale Dosis darstellen. Ihr Wirkungsmechanismus ist wahrscheinlich von dem der Kallikrein-Inaktivatoren verschieden, so daß beide Substanzen nebeneinander gegeben ihre Wirkung steigern können (22) (MARX, HENNIG, SCHMUTZLER). Über längere Zeit beim Menschen angewandt, akkumuliert ACS ihre Wirkung, so daß der fibrinolysehemmende Effekt durch sehr geringe Dosen

ACS aufrecht erhalten werden kann. MELANDER und Mitarbeiter (36) haben allerdings bei Ratten nach Dauerapplikation Mißbildungen beobachtet. In sehr hohen Dosen soll ACA auch antikonzeptionell wirken (5 g/kg/die p. o.).

Bislang sehr wenig bekannt ist die 4-Aminomethyl-cyclohexan-carbonsäure-(1), die im angloamerikanischen Schrifttum als Amino-Methyl-Cyclohexane-Carboxylic Acid (AMCHA) bezeichnet wird. In Plasmatesten soll ihr nach LOHMANN und Mitarbeitern die vierfache Wirkung, im Euglobulinlysistest die doppelte Wirkung der ACS zukommen. Ähnliche Angaben machen auch japanische Autoren (OKAMOTO, OKAMOTO). MELANDER und Mitarbeiter (36) konnten zwei Isomeren der AMCHA isolieren, von denen eines als Antifibrinolyticum - Antiproteolyticum völlig wirkungslos ist, während dem anderen die 20-fache Wirkung der ACS zukommt. Ihre gute Wirksamkeit wird von LOHMANN und Mitarbeitern auf den optimalen Abstand zwischen der Amino - und der Carboxyl- gruppe (7 Å) zurückgeführt, ein Abstand, den sie mit der ACS gemeinsam hat (30,31,33,43,45).

Apparaturen und Substanzen:

A) Apparaturen:

- 1) Thermostat nach J. JÜRGENS
- 2) THROMBELASTOGRAPH nach H. HARTERT
- 3) Zentrifuge bis 3.500 UPM
- 4) Cuvetten nach UHLENHUTH
- 5) Ausblaspipetten zu 0,1 und 0,2 ml
Auslaufpipetten zu 1,0 und 10,0 ml
- 6) Häkchen aus rostfreiem Stahl mit genormter Ösengröße

B) Substanzen:

- 1) Agar: Reinagar (BEHRINGWERKE)
- 2) Calciumchlorid-Lösung
 - a) mol/40
 - b) 1,29 % Cal. chlor. anh.
- 3) Caseinum purum (MERCK)
- 4) Fibrinogen:
Rinderfibrinogen (BEHRINGWERKE) 60 mg/Röhrchen
- 5) Inhibitoren:
 - a) 4 - Amino-methyl-cyclohexan-carbonsäure-(1)
AMCHA kristallin
 - b) epsilon-Amino-n-Capronsäure ACS
 - aa) kristallin
 - bb) 10 %-ige Lösung steril (BEHRINGWERKE)
 - c) Kallikrein-Inaktivator ("Trasylol" - BAYER)
1.000 Kallikrein-Inaktivator-Einheiten (KI-E)/ml = 4 mg/ml
 - d) Plasmin-Inhibitor compositum 3472 (BAYER)
bestehend aus: 50.000 KI-E Trasylol + 1 g ACS
pro Ampulle (= 10 ml) steril
- 6) Natriumcitrat-Lösung 3,8 % steril
- 7) Physiologische Kochsalzlösung

8) Pufferlösungen

- a) Phosphatpuffer pH 7,2 (MERCK)
- b) Veronal-Acetatpuffer pH 7,5 (MERCK)

9) Proteolytica:

a) alpha-Chymotrypsin

aa) a-Chymotrypsin CHOAY

Rinderpancreasextrakt, trypsinaktiviert

25 Chymotrypsin-Haemoglobin-Einheiten (Hb-E)

pro Ampulle (≐ 5 ml) ≐ ca. 5 mg/Ampulle

bb) a-Chymotrypsin BOEHRINGER, Pancreasextrakt

kristallisiert, salzfrei, Charge No. 6.223.209

8 E/mg KUNITZ

9.250 E/mg ATEE nach SCHWERT und TAKENAKA

b) alpha-Chymotrypsinogen BOEHRINGER, Pancreasextrakt

kristallisiert, salzfrei, Charge No. 6.233.207

7,1 E/mg KUNITZ

c) Trypsin BOEHRINGER, Pancreasextrakt

kristallisiert, salzfrei, Charge No. 6.203.213

8 E/mg KUNITZ

9.000 E/mg BAEE nach SCHWERT und TAKENAKA

d) Trypsinogen BOEHRINGER, Pancreasextrakt

mit ca. 50 % $MgSO_4$, Charge No. 6.073.205

2,1 E/mg KUNITZ

3.000 E/mg BAEE nach SCHWERT und TAKENAKA

e) Plasmin (BEHRINGWERKE) SK-aktiviert 25 mg = 5E/Ampulle

f) Streptokinase

aa) Streptokinase pro analysi (BEHRINGWERKE)

5000 Ch.-E/Ampulle

bb) Streptase (BEHRINGWERKE) (Reinstreptokinase)

100.000 E und 250.000 E/Ampulle

10) Paraffinum liquidum

11) Thrombin

a) Testthrombin purum (BEHRINGWERKE) 60 NIH-E/Ampulle

b) Topostasin (HOFFMANN LA-ROCHE) 3.000 NIH-E/Ampulle

Methodik:

I. Allgemeines

A) Aufbewahrung der Substanzen:

Die verwendeten Substanzen wurden - je nach der Lagervorschrift der Herstellerfirma bei -20°C , bei $+4^{\circ}\text{C}$ oder bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Unbeständige Inhibitor- und Ferment-Lösungen wurden jeden Tag frisch zubereitet bzw. verdünnt. Die verwendeten Plasmen waren zwischen 30 Minuten und 4 Stunden alt und waren bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden. Humanserum wurde durch Zugabe gleicher Volumina $\text{m}/40 \text{ CaCl}_2$ -Lösung zu Humanplasma gewonnen und für eine spätere Verwendung bei -20°C eingefroren.

B) Allgemeine Versuchsdurchführung:

Sämtliche Thrombin- und Lysis-zeitbestimmungen wurden in genau senkrecht stehenden Uhlenhuthröhrchen, die im Thermostaten auf $+37^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt wurden, durchgeführt. Die verschiedenen Ansatzkomponenten wurden jeweils mit gesonderten Pipetten möglichst schnell nacheinander in die Röhrchen eingebracht, wobei immer die Reihenfolge: Fibrinogen-Substrat (Rinderfibrinogen, Plasma-Serum-Gemisch), Puffer, NaCl , Inhibitor, Proteolyticum und gerinnungsauslösende Substanz (Thrombin, CaCl_2 -Lösung) eingehalten wurde. Vor der Zugabe der letzten Reaktionskomponente wurde ein unmittelbar zuvor ausgeglühtes und in aqua dest. abgekühltes Häkchen eingesetzt. Die letzte Komponente wurde dann zur besseren Durchmischung kräftig eingeblasen.

C) Zeitenbestimmung:

Sämtliche Versuche in vitro sind Endpunktbestimmungen.

1) Gerinnungszeiten:

Als Gerinnungszeit (Thrombinzeit) definiere ich die Zeit, die vom Einbringen der letzten für die Gerinnungsbildung notwendigen Komponente in die Cuvette, bis zum Auftreten eines sichtbaren Gerinnsels

verstreicht. Zur Feststellung eines Gerinnsels wurde das im Reaktionsgemisch befindliche Häkchen etwa im Sekundenabstand leicht angehoben und auf ein etwa haften gebliebenes Gerinnsel kontrolliert. Sobald dieses Ereignis eintrat, wurde gestoppt. Die Beobachtung erfolgte bei indirekter Beleuchtung und gegen einen schwarzen Hintergrund. Thrombinzeiten unter 3 Sekunden wurden wegen der Unmöglichkeit einer exakten Bestimmung verworfen und durch entsprechende Konzentrationsänderungen der Reaktionskomponenten verlängert.

2) Lysiszeiten:

Als Lysiszeit definiere ich die Zeit, die vom Eintritt der Gerinnung (Feststellung siehe oben) bis zur vollständigen Auflösung des Gerinnsels verstreicht. Nach Eintritt der Gerinnung wurde das Häkchen zweimal 360° um die eigene Achse gedreht und damit das Gerinnsel völlig von der Wand des Uhlenhuthröhrchens abgetrennt. Durch zeitliche Betrachtung konnte dann die Gerinnselgröße optisch kontrolliert werden. Sobald sich das Gerinnsel erheblich zu verkleinern begann, wurde das Häkchen durch leichtes Anheben - wie bei der Bestimmung der Gerinnungszeiten - auf Fibrinrückstände kontrolliert. Diese Methode scheint mir gegenüber der rein visuellen, wie sie HENNIG angegeben hat, und bei der das Aufsteigen der ersten Luftblasen aus dem Gerinnsel als Eintritt der Lysis gewertet wird, den Vorteil zu haben, daß tatsächlich das Verschwinden der letzten noch makroskopisch sichtbaren Fibrinrückstände beobachtet werden kann. Bei der HENNIG'schen Methode konnte ich wiederholt feststellen, daß eine Auflockerung des Gerinnsels genügt, um bei leichtem Schütteln die in ihm eingeschlossenen Luftbläschen aufsteigen zu lassen, während mit der Häkchenmethode noch deutliche Fibrinreste nachweisbar waren.

Sämtliche Lysis- und Gerinnungszeiten wurden bis zu 2 Stunden im Thermostaten verfolgt, bei längeren Lysiszeiten wurde das Reaktionsgemisch mit Paraffin überschichtet und im Brutschrank

bei + 37°C aufbewahrt und von Zeit zu Zeit kontrolliert. Thrombinzeiten über 2 Stunden wurden als Ungerinnbarkeit des Reaktionsgemisches gewertet. Die Überwachung wurde grundsätzlich nach 48 Stunden abgebrochen, da nach dieser Zeit der Bakterien- und Pilzbefall, für den die Reaktionsgemische zumeist ideale Nährböden darstellten, auch wenn er makroskopisch noch nicht sichtbar war, soweit fortgeschritten gewesen sein dürfte, daß er den weiteren Versuchsverlauf mit Sicherheit wesentlich mitbeeinflußt hätte. Das verdeutlicht auch die Fibrinplattenmethode nach ASTRUP, bei der sich - trotz Einhaltung steriler Kautelen - nach 24 Stunden neben den Lysiszonen, die durch das aufgebraachte Proteolyticum ausgebildet werden, auch kleine Lysiszonen, die sich rasch vergrößern und die von Bakterien herrühren, bilden.

II. Ansätze:

Als Substrate für eine Gerinnungsbildung wurde entweder Rinderfibrinogen oder Humanplasma (Einzelplasma mit normalem Gerinnungsstatus und Blutbild oder Mischplasmen von jeweils mindestens 5 Patienten mit Prothrombinspiegeln zwischen 80 und 100 %) verwendet. Die Plasmen waren in jedem Fall Citratplasmen (1 Teil Natriumcitrat 3,8 % + 4 Teile Blut, Abtrennung der zellulären Elemente durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 3.000 UPM).

Es kamen 2 Grundansätze zur Anwendung:

1) 0,20 ml Fibrinogen 0,6 %

0,10 ml Zusätze (NaCl, Inhibitoren, Proteolytica)

0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml

2) 0,10 - 0,15 ml Humanplasma

0,05 ml Humanserum

0,10 - 0,20 ml Zusätze (NaCl, Pufferlösungen, Inhibitoren
oder inhibitorhaltige Plasmen, Proteolytica
oder proteolyticumhaltige Plasmen)

0,04 ml CaCl_2 1,29 %

Dabei wurden für Thrombin- und Lysiszeitbestimmungen die einzelnen Komponenten schnell nacheinander zusammengegeben. Zur Bestimmung der Fibrinogenolyse wurden alle Komponenten außer Thrombin oder CaCl_2 zusammengegeben und über wachsende Zeitabstände inkubiert. Nach diesen Inkubationszeiten wurde das verbliebene Fibrinogen zur Gerinnung gebracht. Die Thrombinzeit kann bei diesem Ansatz als Maß für die Fibrinogenverdauung dienen, nachdem in einer Reaktion die Konzentrationen der Reaktionspartner die Geschwindigkeit der Reaktion bestimmen. Auf die vielfach geübte Lysiszeitbestimmung des Restfibrins wurde verzichtet, da einmal die Lysiszeitbestimmung gegenüber der Thrombinzeitbestimmung wegen der Ungenauigkeit bei der Feststellung des Endpunktes die größeren Fehler birgt und weil zum Zweiten während der Incubationszeit auch die Proteolytikonkonzentration abnimmt und somit bei der Lysiszeitbestimmung einen weiteren Unsicherheitsfaktor darstellt.

Auf eine detailliertere Darstellung der einzelnen Ansätze möchte ich an dieser Stelle verzichten und sie wegen der besseren Überschaubarkeit lieber vor jedem Versuch eigens geben.

III. Thrombelastographische Fibrinolysebestimmung:

A) Ansätze:

Die Ansätze für diese Bestimmungsmethode mußten insofern modifiziert werden, als die Stahlcuvette des Thrombelastographen nach HARTERT nur 0,3 ml faßt. Auch hier werde ich die Ansätze vor jedem Versuch eigens angeben.

B) Arbeitsweise des Thrombelastographen, technische Durchführung und Auswertung der resultierenden Thrombelastogramme (TEG): Grundsätzlich muß gesagt werden, daß das TEG nur Aussagen über das mechanische Verhalten eines Gerinnsels zu machen vermag. Es ist ein relativ grobes Verfahren, bei dem minimale Gerinnsel leicht zerstört und deshalb nicht registriert werden. So ergeben sich regelmäßig gegenüber der Häkchenmethode für die Thrombinzeiten zu

lange und für die Lysiszeiten zu kurze Werte. Diesen Nachteilen stehen gewaltige Vorteile gegenüber:

Bei langen Lysiszeiten, bei denen mit der Häkchenmethode der Endpunkt der Fibrinolyse bestenfalls auf Stunden genau definiert werden kann, erlaubt das TEG immer noch eine Bestimmung auf Minuten-genauigkeit. Desweiteren gestattet es diese Methode, die mechanischen Eigenschaften des Gerinnsels für jeden Zeitpunkt seines Bestehens zu ermitteln, während die Häkchenmethode nur die Kontrolle des Zeitpunktes des Auftretens und Verschwindens eines Gerinnsels und daneben höchstens noch visuell ein grobes Abschätzen der Gerinnselgröße und -dichte zuläßt. Außerdem hält das TEG den Versuchsverlauf dokumentarisch fest.

Die Thrombelastographie gehört heute schon soweit zu den Standarduntersuchungsmethoden eines guten Gerinnungslabors, daß ich auf eine nähere Beschreibung der Arbeitsweise der Apparatur, die technische Durchführung und die Auswertungsmethode der resultierenden Photokymogramme an dieser Stelle verzichten kann. Es sei zu diesem Zweck auf die Originalbeschreibung HARTERT's und die ausgezeichnete Darstellung von HENNIG verwiesen.

IV. Fehlerbreite:

Die möglichen Fehlerquellen kann man in zwei Gruppen aufteilen:

A) Substanzenbedingte Fehler:

Trotz peinlichster Einhaltung der Lagerungsvorschriften unterscheiden sich die einzelnen Chargen an Fibrinogen, Thrombin (insbesondere Topostasin) usw. in ihren Aktivitäten. Für Fibrinogen BEHRINGWERKE wurden entsprechende Studien von SILBERNAGEL durchgeführt. Ähnliche Schwankungen fallen auch bei Plasmaansätzen auf. Trotz Verwendung von Mischplasmen oder Plasma ein und desselben Spenders, das immer unter gleichen Bedingungen abgenommen wurde, differieren die Ergebnisse desselben Ansatzes von Tag zu Tag erheblich. HENNIG hat für diese Materialschwankungen eine Fehlerbreite von $\pm 15\%$ errechnet, eine Abweichung, die wohl für diese Art von Ansätzen grundsätzliche Bedeutung besitzt. Um

eine derart hohe Fehlerquote einigermaßen auszuschließen, habe ich an jedem Versuchstag das jeweils verwendete Plasma und Serum bzw. Fibrinogen und Thrombin neu ausgetestet und alle gefundenen Werte dieses Versuchstages auf diese "Tagesbezugskurve" relativiert. Der Nachteil einer geringeren Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der einzelnen Versuche wird durch die wesentlich höhere Präzision der Einzelaussage aufgewogen.

B) Persönliche Fehler:

Diese setzen sich wiederum aus zwei Komponenten zusammen. Zunächst aus Fehlern beim Verdünnen und Pipettieren. Die Größe dieses Fehlers ist der Zahl der Pipettier- und Verdünnungsvorgänge von den Stammlösungen bis zum fertigen Ansatz direkt proportional. Es versteht sich von selbst, daß Verdünnungen immer von der Stammlösung ausgehend angefertigt wurden. Die zweite Fehlerquelle liegt in der Zeitmessung. Dabei spielt die Reaktionszeit, die vom Erkennen des zu stoppenden Endpunktes bis zur tatsächlichen Bedienung der Stoppuhr verstreicht, nur eine untergeordnete Rolle, da sie einmal im Bereiche von Sekundenbruchteilen liegt und zum anderen erstaunlich konstant ist.

Die weitaus größten Irrtumsmöglichkeiten liegen bei der generellen Erkennung des Endpunktes. Das ist vor allem der Fall bei sehr langen Lysiszeiten, bei denen sich häufig ein End-"punkt" nicht feststellen läßt, sondern bestenfalls noch eine End-"zeitspanne", innerhalb der eine genauere Festlegung des definitiven Schlußpunktes der Reaktion nicht mehr möglich ist. Diesen persönlichen Fehler habe ich für 150 Thrombinzeitbestimmungen, die zwischen 2 bis 7-fach durchgeführt wurden und alle Ansätze mit 4 - 12 Verdünnungs- und Pipettiervorgängen umfaßten und für 121 Lysiszeitbestimmungen, die 2 bis 4-fach durchgeführt wurden und alle Ansätze mit 6 - 14 Verdünnungs- und Pipettiervorgängen umfaßten, mit den üblichen Methoden berechnet:

Zunächst wurde aus den jeweiligen Mehrfachbestimmungen das arithmetische Mittel ermittelt nach der Formel:

$$M = \frac{A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n}{n}$$

wobei A_1, A_2 usw. die Einzelwerte darstellen und M das arithmetische Mittel symbolisiert. Dieser Wert diente als Ausgangswert (100 %) zur Ermittlung der prozentualen Einzelabweichung a_1, a_2 usw. Die größte prozentuale Einzelabweichung heißt $a_{\max.}$. Das arithmetische Mittel der prozentualen Einzelabweichungen (m)

$$m = \frac{a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n}{n}$$

ergab die mittlere prozentuale Abweichung. Die Werte m der Thrombinzeiten und Lysiszeiten wurden in Gruppen eingeteilt, innerhalb derer nochmals das arithmetische Mittel errechnet wurde (M_g). Diese Zahl gibt Auskunft über die mittlere Fehlerbreite der Bestimmungen innerhalb dieser Gruppe. Als maximale prozentuale Abweichung innerhalb der Gruppen gilt weiterhin $a_{\max.}$.

Tabelle 1: Fehlerbreite

A) Thrombinzeiten:

M in "	$a_{\max.}$ %	m %	Anzahl der Parallelbestimmungen
--------	---------------	-------	---------------------------------

1) 3" - 6"

3,8	2,63	2,63	3
4,1	4,88	2,44	4
5,1	3,93	3,93	3
5,3	5,66	3,77	7
5,4	1,85	1,85	2
5,6	5,36	3,57	4

$$M_g = \pm 3,10 \% \quad 23 \text{ Werte}$$

M in "	a max. %	m %	Anzahl der Parallelbestimmungen
--------	-------------	-----	------------------------------------

=====

2) 6" - 8"

6,0	5,00	3,33	4
6,1	1,64	1,64	3
6,2	4,84	3,22	3
6,3	1,59	1,59	3
6,3	1,59	0,52	3
6,3	6,35	3,17	3
6,4	3,13	1,56	4
6,6	1,52	0,51	3
6,8	1,47	1,10	4
6,9	2,90	1,45	3
7,0	2,86	1,43	3
7,0	1,43	0,47	3
7,1	2,82	1,41	3
7,2	2,78	2,78	3
7,2	2,78	2,78	3
7,5	10,67	6,66	3
7,6	1,32	1,32	3
7,6	2,63	0,69	3
7,8	3,85	2,57	3

$M_g = \pm 2,01 \% \quad 60 \text{ Werte}$

3) 8" - 10"

8,3	8,44	4,82	3
8,4	4,76	4,76	2
8,4	10,71	5,95	5
8,8	2,27	2,27	3
8,8	3,41	2,27	4

$M_g = \pm 3,80 \% \quad 17 \text{ Werte}$

4) 10" - 15"

10,3	18,45	8,74	5
10,4	11,55	4,81	4
10,9	2,76	1,84	5
11,1	2,70	2,70	2
11,3	1,77	0,89	3
11,5	11,30	7,83	3
13,3	1,51	0,76	4
13,9	1,44	0,72	3
14,0	6,43	3,57	5
14,0	1,43	1,43	4
14,0	6,42	4,28	3
14,8	11,48	8,11	3

$M_g = \pm 3,84 \% \quad 44 \text{ Werte}$

M in"	a max. %	m %	Anzahl der Parallelbestimmungen
-------	-------------	-----	------------------------------------

=====

5) über 15"

26,0	3,08	3,08	2
26,7	2,97	2,97	2
39,7	3,53	3,40	2

$M_g = \pm 3,15 \%$ 6 Werte
 =====
 150 Werte

B) Lysiszeiten:

1) 0" - 200"

118	4,24	2,54	4
119	0,84	0,84	2
122	3,30	1,64	4
130	0,76	0,76	2
131	0,76	0,76	2
137	0,73	0,73	2
140	4,28	2,14	4
169	1,78	1,78	2
185	4,30	2,20	4
185	4,32	2,16	4
192	1,41	1,41	2

$M_g = \pm 1,53 \%$ 32 Werte

2) 200" - 400"

221	22,20	12,20	4
236	0,85	0,85	2
247	3,64	2,43	3
255	2,65	1,18	4
265	4,15	2,64	3
296	7,10	3,40	4
305	5,90	5,90	2
324	0,31	0,31	2
342	2,63	1,46	4
390	0,25	0,25	2

$M_g = \pm 3,56 \%$ 30 Werte

M in"	a _{max.} %	m %	Anzahl der Parallelbestimmungen
-------	---------------------	-----	------------------------------------

3) 400" - 600"

405	9,40	6,20	3
426	0,47	0,47	2
458	0,44	0,44	2
459	1,52	1,09	3
460	5,60	5,60	4
493	1,06	1,06	3
524	7,90	5,30	4
525	2,10	2,10	2
528	7,50	7,50	2

$$M_g = \pm 1,19 \% \quad 25 \text{ Werte}$$

4) 600" - 800"

617	10,00	10,00	2
634	2,80	2,80	2
645	10,10	5,90	4
711	2,40	2,40	2
733	19,70	9,35	4
758	0,60	0,60	2

$$M_g = \pm 5,79 \% \quad 16 \text{ Werte}$$

5) 800" - 1.000"

826	10,20	6,80	3
888	1,05	0,53	3
890	0,18	0,18	2

$$M_g = \pm 2,79 \% \quad 8 \text{ Werte}$$

6) über 1.000"

1024	5,90	5,90	2
1114	1,18	1,18	2
1305	16,20	16,20	2
2113	5,10	3,70	4

$$M_g = \pm 6,14 \% \quad 10 \text{ Werte}$$

=====

121 Werte

Der maximale durchschnittliche Fehler liegt für die Thrombinzeiten also etwas niedriger als für die Lysiszeiten. Bei den Thrombinzeiten kommt er aber erst bei Werten über 8" zum Tragen, da bis zu diesem Werte der durchschnittliche Fehler noch innerhalb der Reaktionszeit liegt.

Die durchschnittlichen Fehler ergeben also Streubezirke für die einzelnen Fehler. Es unterscheiden sich zwei Werte nur voneinander, wenn sich ihre Streubezirke nicht berühren.

Versuche in vitro:

Diese Versuche gliedern sich grundsätzlich in zwei Teile:

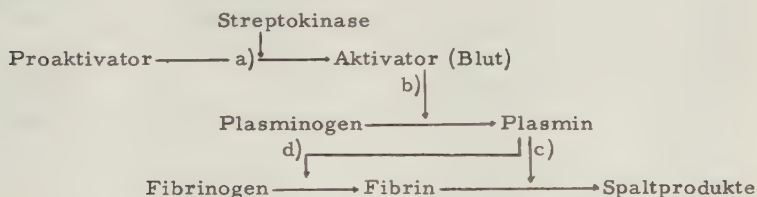
- 1) Versuche mit Fibrinolytica
- 2) Versuche mit Proteolytica

Dabei soll jeweils der Einfluß der Inhibitoren ermittelt werden.

1) Versuche mit Fibrinolytica:

Es wurden die drei Inhibitoren Trasylol, AMCHA und ACS auf ihre Einflußnahme auf die Wirkung der Fibrinolytica hin untersucht. Es sollten dabei prinzipielle Wirkungsmechanismen, insbesondere die verschiedenen Angriffspunkte auf die Fibrinolyse untersucht werden, um somit Grundlagen für die Untersuchungen in vivo zu schaffen. Dabei war es mit klar, daß die in diesem Teil gewonnenen Aussagen nur mittelbare Schlüsse auf die Vorgänge in vivo zulassen.

Meinen Überlegungen legte ich folgendes Schema der Fibrinolyse zugrunde (SCHMUTZLER und BECK):



Es ergeben sich für die Inhibitoren grundsätzlich 4 verschiedene Angriffspunkte:

a) Die Bildung von Aktivator des Plasminogen-Plasminsystems kann verhindert werden, wobei ein entsprechender Versuch keine Aussage darüber zuläßt, ob der eigentliche Angriffspunkt die Streptokinase oder der Proaktivator ist.

b) Es kann die Bildung von Plasmin verhindert werden, wobei wiederum die Frage der Hemmung des Gesamtschrittes, nicht aber die des genauen Angriffspunktes innerhalb dieses Schrittes geklärt wird.

c) Es kann auch die Aufspaltung des Fibrins durch Plasmin in Fibrinopeptide gehemmt oder unterbunden werden.

d) Als letzte Möglichkeit kann eine Zerstörung des Fibrinogens durch das Plasmin von den Inhibitoren verhindert oder gehemmt werden.

a) Hemmung der Streptokinasewirkung:

Ansatz:

0,15 ml Humanplasma

0,05 ml Humanserum (1:1)

0,05 ml NaCl

0,05 ml Inhibitoren oder NaCl (im Leerversuch)

0,05 ml SK 50 E/Ansatz

0,04 ml CaCl_2 1,29 %

Leerwert: 2' 17,2" (Mittelwert)

Menge in gamma	Lysiszeiten Trasylol	ACS	AMCHA
0,5	----	----	3' 12,8"
1,0	----	3' 22,2"	4' 03,2"
2,5	----	4' 33,1"	6' 05,2"
4,0	3' 23,2"	----	----
5,0	3' 55,0"	5' 35,3"	8' 07,8"
7,5	4' 03,2"	----	12' 33,6"
10,0	5' 12,1"	8' 47,8"	gr. 1h
12,5	6' 58,8"	----	----
15,0	8' 42,8"	12' 14,3"	----
20,0	15, 10,0"	gr. 1h	----
40,0	gr. 1h	----	----

Abbildung 1

Es ergibt sich zunächst, daß alle drei Inhibitoren dosisabhängig die Bildung von Blutaktivator hemmen. Dabei wirkt AMCHA in allen Konzentrationen fast genau doppelt so stark wie ACS. Eine derartige einfache Relation läßt sich zu Trasylol nicht herstellen: Während es in geringen Dosen wesentlich schlechter als die beiden anderen Inhibitoren wirkt, hat es in höheren Dosen einen deutlich höheren Wirkungszuwachs. AMCHA ist in diesem Schritt den beiden anderen Inhibitoren - vor allem dem Trasylol - bei weitem überlegen. Es stellt also das Streptokinaseantidot par excellence dar.

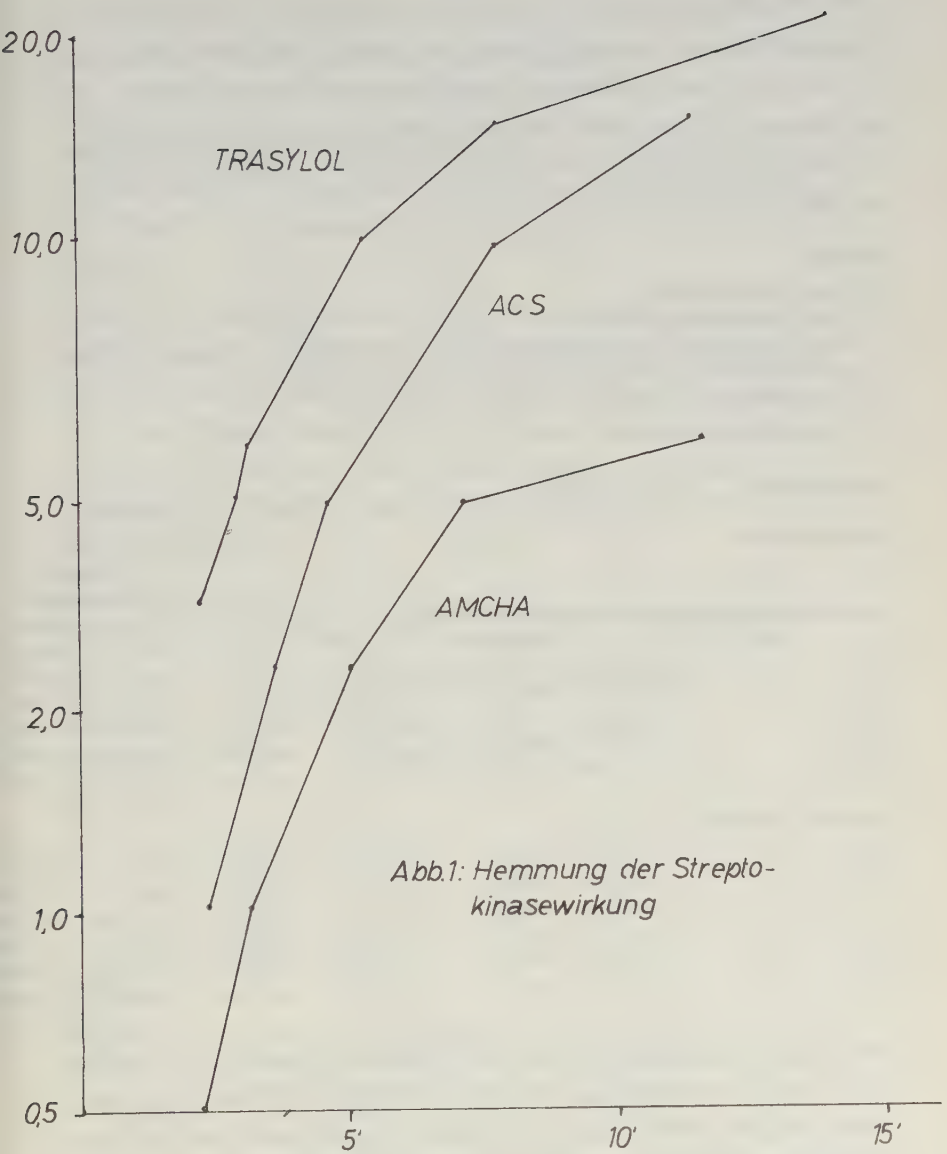


Abb.1: Hemmung der Streptokinasewirkung

Abscisse: Lysiszeiten in Minuten

Ordinate: log. der Inhibitorenkonzentration in gamma

Superaddition:

Schon HENNIG wies darauf hin, daß sich Trasylol und ACS in ihrer Wirkung nicht einfach addieren, sondern steigern (superaddieren). Im folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob sich Trasylol auch mit AMCHA superaddiert und ob diese Superadditionswirkung größer ist, als die zwischen Trasylol und ACS.

Ansatz:

0,15 ml Humanplasma
0,05 ml Humanserum (1:1)
0,05 ml Trasylol in verschiedenen Konz. oder NaCl
0,05 ml Inhibitoren in verschiedenen Konz. oder NaCl
0,05 ml SK 50 E/Ansatz
0,04 ml CaCl_2 1,29 %

Ergebnisse:

Lyszeiten

ACS (gamma)	0	4	8	12	16	20
						γ / Ansatz Trasylol
0	2' 17,2"	3' 23,2"	4' 09,2"	6' 52,8"	9' 02,8"	15' 10,0"
1,0	3' 22,2"	4' 31,4"	6' 27,8"	gr. 1h	gr. 1h	gr. 24h
2,5	4' 33,1"	4' 51,7"	7' 10,3"	gr. 1h	gr. 1h	gr. 24h
5,0	5' 35,3"	7' 20,9"	27' 13,6"	gr. 1h	gr. 24h	gr. 24h
10,0	8' 47,8"	17' 23,4"	gr. 1h	gr. 24h	gr. 24h	gr. 24h
15,0	12' 14,3"	gr. 1h	gr. 1h	gr. 24h	gr. 24h	gr. 24h

AMCHA (gamma)

0	2' 17,2"	3' 23,2"	4' 09,2"	6' 52,8"	9' 02,8"	15' 10,0"
0,5	3' 12,8"	4' 52,4"	6' 01,1"	8' 17,8"	gr. 1h	gr. 24h
1,0	4' 03,2"	5' 13,5"	9' 24,9"	gr. 1h	gr. 24h	gr. 24h
2,5	6' 05,2"	11' 14,9"	gr. 1h	gr. 24h	gr. 24h	gr. 24h
5,0	8' 07,8"	58' 08,7"	gr. 24h	gr. 24h	gr. 24h	gr. 24h
7,5	12' 33,6"	gr. 1h	gr. 24h	gr. 24h	gr. 24h	gr. 24h

Es zeigt sich, daß sich nicht nur ACS (HENNIG), sondern auch AMCHA mit Trasylol superaddiert. Legt man für AMCHA in diesem Test eine doppelt so gute Wirkung wie für ACS zugrunde und arbeitet mit den halben Konzentrationen, so zeigt sich, daß die Superaddition von Trasylol mit AMCHA wesentlich ausgeprägter, als die mit ACS ist.

Es muß aber nochmals betont werden, daß diese Aussage nur für diesen Ansatz Geltung hat.

b) Hemmung der Humanplasminwirkung im Fibrinplattentest:

Ansatz: 0,0175 ml SK = 11,5 E/Ansatz
0,0075 ml Plasma (Human)

werden auf Astrup-Platten (Normalfibrin- und Hitzefibrinplatten) aufgebracht und 40 Stunden bei 37°C bebrütet. Das Produkt zweier senkrecht aufeinanderstehender Lysishofdurchmesser gilt als Ergebnis.

In den Hitzefibrinplatten wurde das im Rinderfibrinogen enthaltene Plasminogen zerstört, so daß etwaige Lysishöfe nur auf die Aktivität des zugegebenen Plasmins zurückzuführen sind. Anders in den Normalfibrinplatten; der mit dem Gemisch zugegebene Aktivator des Plasminogens findet reichlich Substrat im Rinderfibrinogen vor, es entsteht also wesentlich mehr Plasmin als auf der Normalplatte.

Ergebnisse:

Trasylol: Leerwert: Normal: 53 mm² Hitze: 75 mm²

γ /Ansatz	Hitzeplatte	Normalplatte
400	38 mm ²	21 mm ²
200	38	21
100	38	21
40	38	41
20	38	53
4	55	67

ACS:

mg/Ansatz	Hitzeplatte	Normalplatte
1,0	59 mm ²	46 mm ²
0,5	67	53
0,1	59	53
0,05	45	60
0,01	59	60
0,005	59	67

AMCHA:

mg/Ansatz	Hitzeplatte	Normalplatte
0,5	71	27
0,1	61	27
0,05	54	27
0,01	48	27
0,005	35	27
0,001	61	27

Trasylol: Die Kurven nehmen ungefähr den gleichen Verlauf, die etwas schlechtere Wirkung auf der Normalplatte erklärt sich aus dem vermehrten Plasminangebot auf dieser Platte.

ACS: Die Ergebnisse sind denen, die man mit Trasylol erzielt, ganz ähnlich, vor dem erhöhten Plasminangebot auf der Normalplatte versagt die verwendete Dosis ACS völlig.

AMCHA: Erstaunlich ist, daß AMCHA auf der Normalplatte in allen Konzentrationen relativ gut hemmt, während das auf der Hitzeplatte nicht der Fall ist. Die einzig mögliche Erklärung hierfür ist die, daß AMCHA die Entstehung von Plasmin aus Rinderplasminogen verhindert, wobei aber nicht entschieden werden kann, ob sie das über ein Angreifen am Plasminogen oder am Aktivator des Plasminogen-Plasminsystems erreicht. Die Ergebnisse auf der Hitzeplatte zeigen aber, daß AMCHA auch Plasmin hemmt, und zwar etwas besser als ACS.

c) Hemmung der Fibrinolyse

Ansatz:

0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 % (BEHRINGWERKE)

0,05 ml Inhibitoren verschiedener Konz. oder NaCl (Leervers.)

0,05 ml Schweineplasmin novo 0,05 E/Ansatz

0,20 ml Testthrombin (BEHRINGWERKE) 10 NIH-E/ml

Ergebnisse:

Inhibitorkonz. in gamma	Lysiszeiten		ACS
	Trasylol	AMCHA	
0	109,5"	109,5"	109,5"
1,0	149,6"	---	---
2,5	---	138,0"	134,6"
5,0	171,6"	141,4"	137,7"
7,5	---	145,6"	---
10,0	507,2"	150,9"	142,6"
15,0	---	162,6"	---
20,0	gr. 2 h	177,3"	156,8"
25,0	---	179,4"	---
50,0	---	181,7"	170,0"
100,0	---	198,8"	179,4"
250,0	---	244,5"	---

Abbildung 2

Alle Inhibitoren hemmen diesen Schritt dosisabhängig. Das Verhältnis der die gleiche Lysiszeitverlängerung auslösenden Inhibitormengen ist jedoch nicht konstant, sondern wechselt von Lysiszeit zu Lysiszeit. Für die Lysiszeit von ca. 150" ergibt sich ein Verhältnis Trasylol:AMCHA:ACS = 1:10:15, für die von ca. 180" eines von 1:5:20. Gegenüber Trasylol besitzt also AMCHA einen relativ höheren, ACS einen relativ niedrigeren Wirkungszuwachs mit steigender Dosis. Ein absoluter Dosisvergleich ist daher nicht möglich. Andererseits legt dieses Ergebnis den Gedanken nahe, daß die Inhibitoren vielleicht einen verschiedenen Wirkungsmechanismus innerhalb dieser Versuchsanordnung besitzen.

Wirkung von Inhibitorenmischungen:

Ansatz:

0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 % (BEHRINGWERKE)

0,05 ml Schweineplasmin novo 0,05 E/Ansatz

0,05 ml Inhibitoren oder deren Mischungen oder NaCl (Leervers.)

0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (Topostasin)

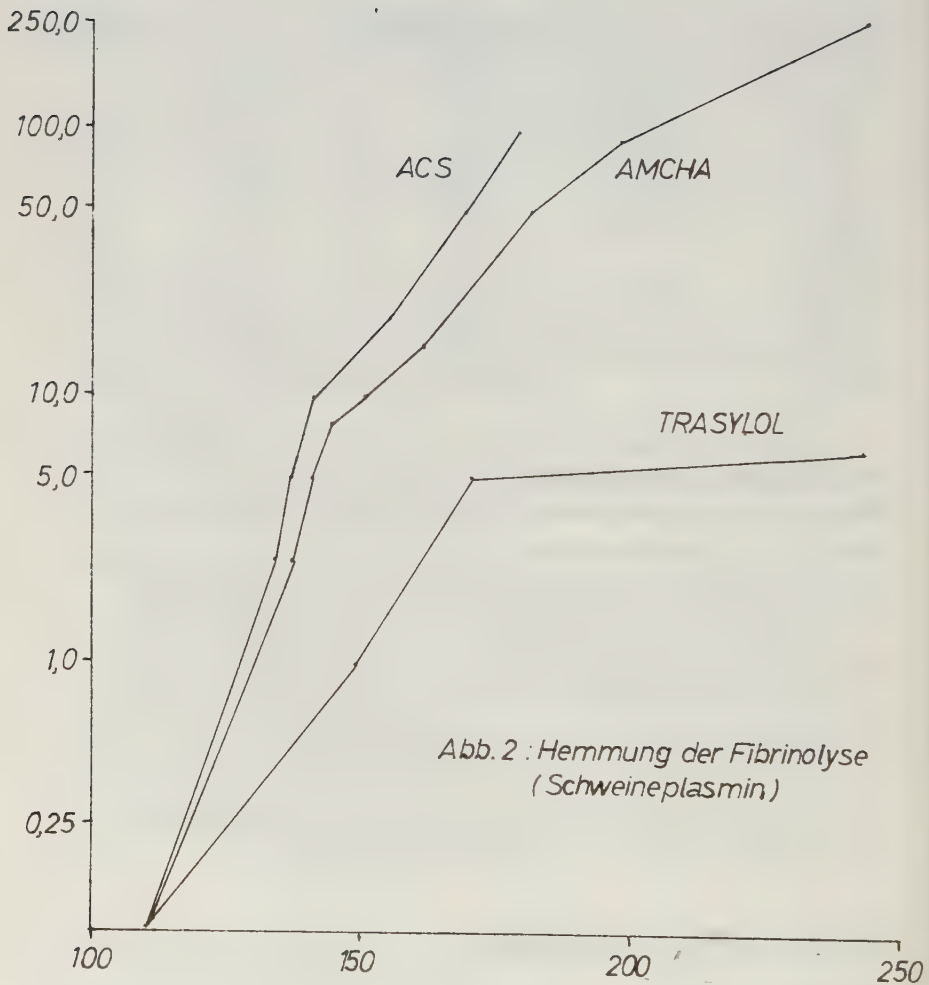


Abb. 2 : Hemmung der Fibrinolyse
(Schweineplasmin)

Abcisse: Lysiszeiten in Sekunden

Ordinate: log. der Inhibitorenkonzentrationen in gamma

Ergebnisse:

Inhibitor:	Lysiszeit:
NaCl (Leerwert)	57,3"
Trasylol 8 γ /Ansatz	95,0"
AMCHA 20 gamma/Ansatz	101,0"
ACS 62,5 gamma/Ansatz	183,4"
Trasylol 4 γ + AMCHA 10 gamma/Ansatz	207"
Trasylol 4 γ + ACS 31,25 gamma/Ansatz	188"
AMCHA 10 gamma/Ans. + ACS 31,25 gamma/Ans.	105"
Trasylol 8/3 γ + ACS 21 gamma/Ans. + AMCHA 20/3 gamma/Ansatz	105"

Wieder zeigt sich ein Superadditionseffekt für die beiden Kombinationen von Trasylol mit ACS und AMCHA, wobei die letztere Kombination besser wirkt. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Mischungen, bei denen AMCHA und ACS enthalten sind. Selbst bei Zusatz von $1/3$ Trasylol wirken sie schlechter als die entsprechenden Stammlösungen. Sie addieren also nicht einmal. Es läßt sich daraus schließen, daß Trasylol einerseits und AMCHA und ACS andererseits verschiedene Wirkungsmechanismen besitzen. ACS und AMCHA dürften einen ähnlichen Angriffspunkt haben, was sich aus der ähnlichen Struktur und dem gleichen Abstand der wirk-samen Gruppen ($7 \text{ \AA}$) ergibt. Allerdings weist die Tatsache, daß sich auch diese beiden Inhibitoren in ihrer Wirkung gegenseitig stören, darauf hin, daß sie nicht genau den gleichen Angriffspunkt be-sitzen.

d) Hemmung der Plasminfibrinogenolyse:

Ansatz:

0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 %

0,05 ml Inhibitoren versch. Konz. oder NaCl (Leerversuch)

0,05 ml Plasmin novo 500 gamma/ml oder NaCl (Leerversuch)

2^h incubieren

0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (BEHRINGWERKE)

Ergebnisse:

Inhibitorkonz. in gamma	Thrombinzeiten		
	Trasylol	AMCHA	ACS
0 (ohne Plasmin)			11,1"
0 (mit Plasmin)			39,7"
2,5	---	33,6"	38,1"
5,0	21,8"	34,2"	36,7"
7,5	---	35,2"	---
10,0	15,5"	35,5"	31,4"
15,0	---	34,9"	---
20,0	13,3"	35,8"	28,8"
25,0	---	33,6"	---
40,0	13,0"	---	---
50,0	---	36,2"	27,0"
100,0	14,2"	---	24,1"
200,0	15,6"	---	---

Abbildung 3

ACS hemmt diesen Schritt dosisabhängig recht ordentlich, wenn auch wesentlich schlechter als Trasylol. Trasylol hat in diesem Test eine ausgezeichnete Inhibitorwirkung, mit einem Wirkungsoptimum im Bereich von etwa 40 γ / Ansatz = 800 γ / ml. Eine Über- oder Unterschreitung dieses Optimums verschlechtert die Wirkung wieder. Auffallend ist aber vor allem, daß AMCHA in diesem Test keinerlei Wirkung auf diesen Schritt besitzt. Die gewonnenen Werte liegen zwar alle etwas unter dem zugehörigen Leerwert, die Differenz ist aber nicht signifikant und durch Dosiserhöhung nicht zu steigern.

Es besteht die Denkmöglichkeit, daß die Hemmwirkung nicht auf die Wirkung der Inhibitoren, sondern auf die Wirkung von Fibrinogenabbauprodukten, die die Thrombinwirkung und damit die Polymerisation des Fibrinogens zu Fibrin hemmen, also das Antithrombin VI (NIEWAROWSKI und KOWALSKI), zurückzuführen ist. Dagegen spricht allerdings schon die Tatsache, daß eine derartige Hemmwirkung auch nicht bei dem Versuch mit AMCHA, das ja selbst keine Wirkung hat, auftrat. Um aber auszuschließen, daß AMCHA seinerseits nicht das Antithrombin VI hemmt, wurde ein entsprechender Zusatzversuch angestellt.

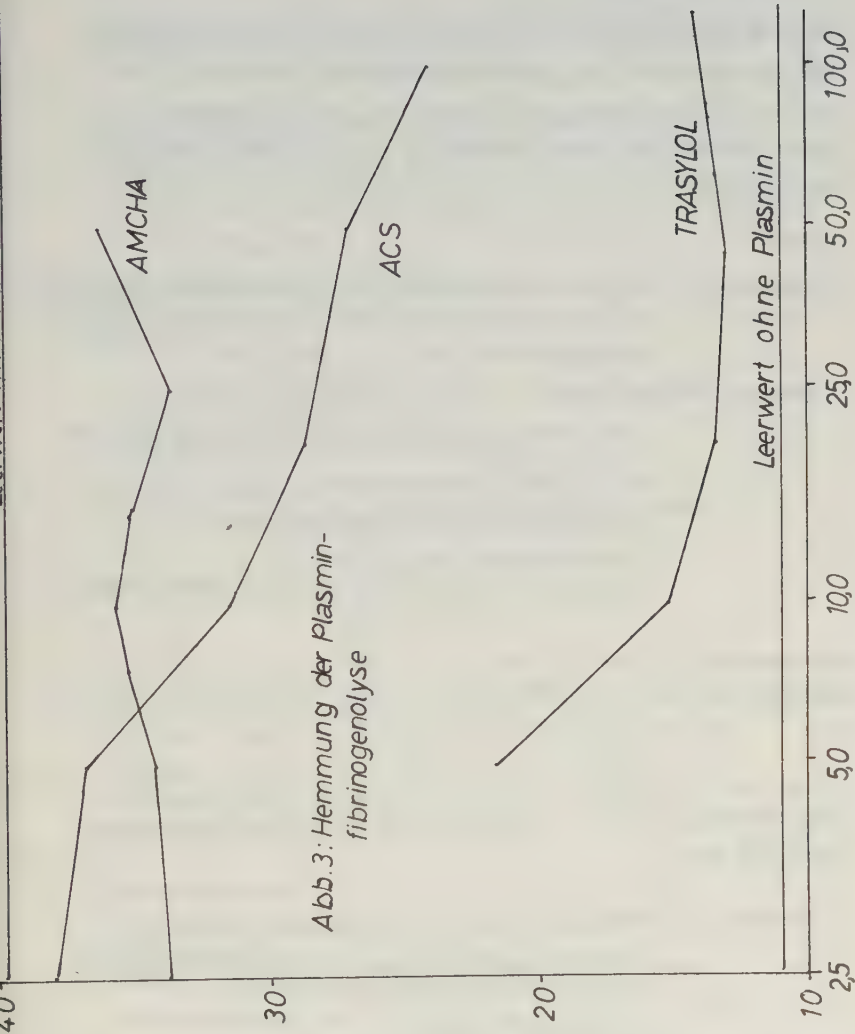


Abb. 3: Hemmung der Plasmin-fibrinogenolyse

Abcisse: log. der Jnhibitorenkonzentrationen in gamma
Ordinate: Thrombinzeiten in Sekunden

Versuchsanordnung:

Man läßt Plasmin auf Fibrinogen einwirken und stoppt nach einer Zeit, die ausreicht, um genügend Antithrombin entstehen zu lassen, die Plasminwirkung mit Trasylol ab. Das so entstandene Gemisch wird dann auf neuem Fibrinogen auf seine Antithrombinwirkung getestet.

Ansatz:

- 1) Leerwert: 0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 % (BEHRINGWERKE)
0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (BEHRINGWERKE)
Thrombinzeiten: 10,9" 12,8" 10,8"

2) Optimale Plasmindosis:

1,00 ml Rinderfibrinogen 0,6 % (BEHRINGWERKE)
0,25 ml NaCl
0,25 ml Plasmin novo versch. Konz.
nach verschiedenen Incubationszeiten:
0,20 ml dieses Gemisches
0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (BEHRINGWERKE)

Plasmin mg/ml	0'	2'	4'	6'	8'	10'	12'
0,1	11,2"	11,5"	12,8"	14,2"	15,9"	14,6"	15,1"
0,2	12,5"	16,4"	16,7"	24,7"	31,2"	34,2"	38,2"

Eine Plasmindosis von 0,2 mg/ml ergibt nach 6' Incubation einen optimalen Wert.

3) Abstoppen der Plasminwirkung durch Trasylol:

0,80 ml Rinderfibrinogen 0,6 % (BEHRINGWERKE)
0,20 ml Plasmin novo 200 gamma/ml
6' incubieren, dann
0,20 ml Trasylol versch. Konz.

Von diesem Gemisch werden nach verschiedenen Incubationszeiten 0,20 ml mit 0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml zur Gerinnung gebracht.

	Gesamtincubationszeit				
	7'	10'	15'	20'	30'
0,320mg Tras./ml	27,4"	27,7"	26,7"	26,1"	24,2"

4) Herstellung eines Gemisches mit den Abbauprodukten:

5,00 ml Rinderfibrinogen 0,6 %
1,25 ml Plasmin novo 0,2 mg/ml

6' incubieren, dann

1,25 ml Trasylol 0,32 mg/ml

Austestung:

0,60 ml Rinderfibrinogen 0,6 %
0,60 ml Gemisch siehe oben

nach verschiedenen Incubationszeiten:

0,20 ml dieses Gemisches
0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (BEHRINGWERKE)

Ergebnisse:

0'	Incubationszeiten:					
	2'	4'	6'	8'	10'	12'
15,6"	15,8"	12,0"	11,7"	12,4"	12,7"	12,2"
13,6"	14,4"	12,1"	10,7"	11,7"	11,3"	11,9"

In jedem der obigen Ansätze waren etwa 0,14 ml F¹ gen und 0,06 ml Plasmin, Trasylol und NaCl enthalten.

5) Kontrollversuch:

0,14 ml Rinderfibrinogen 0,6 %
0,06 ml NaCl
0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (BEHRINGWERKE)

Thrombinzeiten: 14,1" 14,1" 13,1" 14,4" 14,4"

Es zeigt sich also, daß im vorliegenden Versuch keine nennenswerten Mengen Antithrombin VI entstanden sind. Die im vorigen Versuch resultierenden Inhibitorwerte sind also tatsächlich auf die Wirkung der Inhibitoren und nicht auf eine etwaige Antithrombinwirkung zurückzuführen.

2) Versuche mit Proteolytica:

In dieser Versuchsreihe sollten Wirkung und Angriffspunkt der Inhibitoren auf einige Proteolytica untersucht werden.

Als Proteolytica kamen Trypsin und alpha-(a)-Chymotrypsin zur Verwendung, daneben ihre Vorstufen Trypsinogen und a-Chymotrypsinogen. Es sollte zunächst geklärt werden, ob a-Chymotrypsinogen durch Trypsin und Trypsinogen durch a-Chymotrypsin aktiviert werden können und ob sich eine derartige Aktivierung durch die Inhibitoren hemmen oder unterbinden läßt.

A) Aktivierung von a-Chymotrypsinogen zu a-Chymotrypsin durch Trypsin und deren Hemmung:

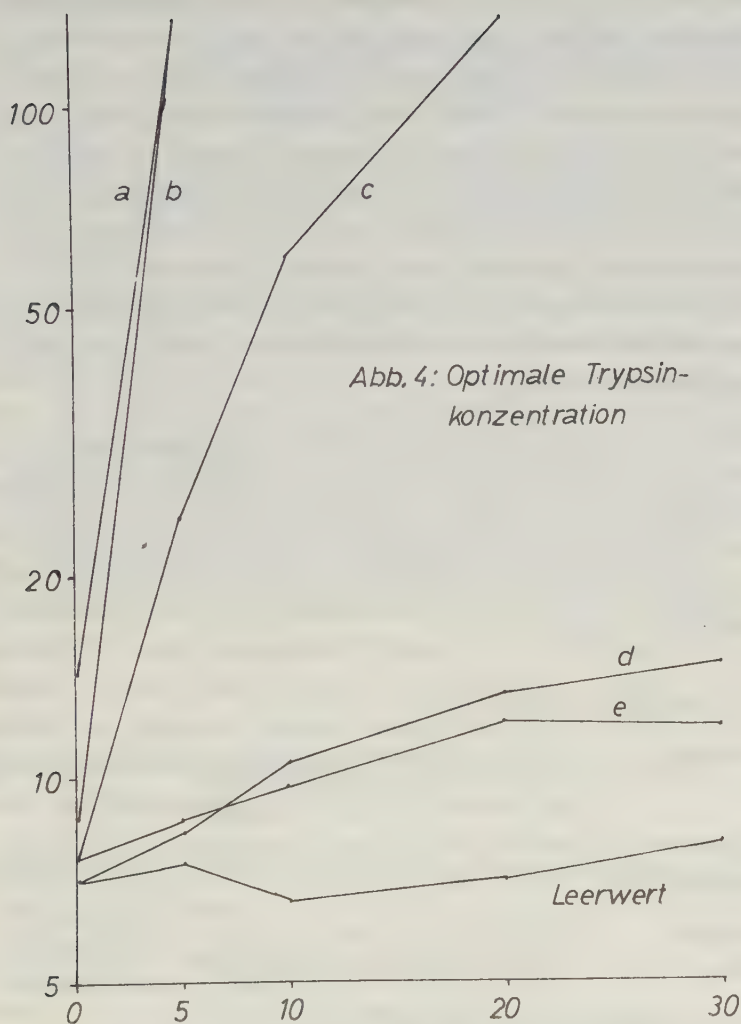
a) Austestung der zur Aktivierung optimalen Trypsinmenge:

Ansatz: 0,90 ml a-Chymotrypsinogen 1 mg%
 0,10 ml Trypsin versch. Konz. oder NaCl (Leervers.)
 45 Stunden bei + 4°C incubieren, dann
 0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 %
 0,10 ml Veronal-Acetate-Puffer pH 7,2
 0,05 ml NaCl
 0,05 ml Gemisch - siehe oben - oder NaCl (Leerwert)
 nach verschiedenen Incubationszeiten:
 0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (ROCHE)

Ergebnisse:

Trypsin in gamma/ml	0 ^a	5 ^a	Incubationszeiten			
			10 ^a	20 ^a	30 ^a	
Leervers.: 6,8"						
0 (Leerwert)	7,1"	7,4"	6,5"	7,1"	8,1"	
20	14,2"	gr. 2 ^a	gr. 2 ^a	gr. 2 ^a	gr. 2 ^a	
10	8,7"	gr. 2 ^a	gr. 2 ^a	gr. 2 ^a	gr. 2 ^a	
5	7,7"	24,4"	60,0"	gr. 2 ^a	gr. 2 ^a	
1	7,0"	8,4"	11,5"	13,3"	14,7"	
0,1	7,7"	8,8"	9,8"	12,2"	12,1"	

Abbildung 4



Abscisse: Incubationszeit in Minuten

Ordinate: log. der Thrombinzeiten in Sekunden

a = 20 gamma/ml b = 10 gamma/ml

c = 5 gamma/ml d = 1 gamma/ml

e = 0,1 gamma/ml

Der Wert 0 zeigt, daß im verwendeten a-Chymotrypsinogen keine Substanzen enthalten sind, die in der Lage sind, es zu aktivieren. Andererseits ist die in den einzelnen Ansätzen enthaltene Menge Trypsin wesentlich zu klein, um die erzielten Effekte selbst, d.h. ohne Aktivierung des a-Chymotrypsinogens, auszulösen. Die Tatsache der Aktivierung ist also sichergestellt. Es ergibt sich weiterhin, daß auch noch geringste Trypsinspuren einen ordentlichen Effekt ergeben. Die Werte in der vorletzten Zeile der Tabelle erhielt ich durch Zugabe von 0,005 gamma (0,00083 mg%) pro Ansatz, die der letzten Zeile durch Zugabe von 0,0005 gamma/Ansatz (0,000083 mg%).

Die für die weiteren Versuche optimale Trypsinmenge liegt zwischen 1 und 5 gamma/ml. Es wird im Folgenden mit 2,5 gamma/ml (0,002 mg% im Ansatz) gearbeitet, einem Optimum, das gut mit den Ergebnissen von AUERSWALD und DOLESCHL übereinstimmt, die für einen ähnlichen Versuch ein Optimum von 2,4 gamma/ml ermittelten.

b) Hemmung der Aktivierung:

Ansatz: 0,45 ml a-Chymotrypsinogen 1 mg/ml
0,50 ml Inhibitoren oder NaCl
0,05 ml Trypsin 2,5 gamma/ml

werden für 1 Stunde bei + 37°C incubiert. An Inhibitoren wurden verwendet:

AMCHA:	1,0	0,5	0,25	0,125	0,025 mg/ml
ACS:	5,0	2,5	0,5	0,25	0,125 mg/ml

Diese Stammgemische wurden auf folgendem Ansatz getestet:

Ansatz: 0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 %
0,10 ml Veronal-Acetatpuffer pH 7,2
0,10 ml Stammgemisch siehe oben
nach verschiedenen Incubationszeiten:
0,20 ml Testthrombin 10 NIH-E/ml (BEHRINGWERKE)

Ergebnisse:

Chymotrypsin
in gamma/Ansatz

Incubationszeiten

	0'	1'	2'	4'	6'	8'	10'	30'
0,2000	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'
0,1000	20,8"	72,2"	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'
0,0500	9,0"	10,3"	16,2"	47,0"	420"	gr. 10'	gr. 10'	gr. 10'
0,0250	8,3"	8,0"	9,1"	13,4"	13,5"	26,1"	120"	gr. 10'
0,0010	7,2"	10,6"	14,3"	---	73,0"	150"	360"	gr. 10'
0,0005	8,5"	7,8"	8,4"	12,5"	16,6"	22,5"	45,3"	180"
0	5,1"	5,0"	5,3"	5,6"	6,0"	5,4"	6,2"	6,1"

Abbildung 5

Das Ergebnis, nämlich daß α -Chymotrypsin in der Lage sein soll, Trypsinogen in Trypsin umzuwandeln, überrascht und stimmt mit den Berichten in der Literatur nicht überein. Da eine Autoaktivierung von Trypsinogen nicht vorliegen kann (Wert 0), handelt es sich wahrscheinlich um eine Verunreinigung des α -Chymotrypsins mit Trypsin. Der Versuch stellt somit eine Modifikation des Versuches auf Seite 43 ff. dar.

B) Hemmung der Aktivierung durch die Inhibitoren:

Ansatz: 0,50 ml Trypsinogen 1 mg/ml
 0,05 ml α -Chymotrypsin 1 gamma/ml
 0,20 ml NaCl oder Inhibitoren versch. Konz.
 wurden 20 h bei + 4°C incubiert und dann in folgendem Ansatz ausgetestet:
 0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 %
 0,10 ml Gemisch - siehe oben -
 nach verschiedenen Incubationszeiten:
 0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (ROCHE),

Es wurden folgende Inhibitoren ausgetestet:

Stammlösungen:

Trasylol 0,8 mg/ml
 AMCHA 2 mg/ml
 ACS 8 mg/ml

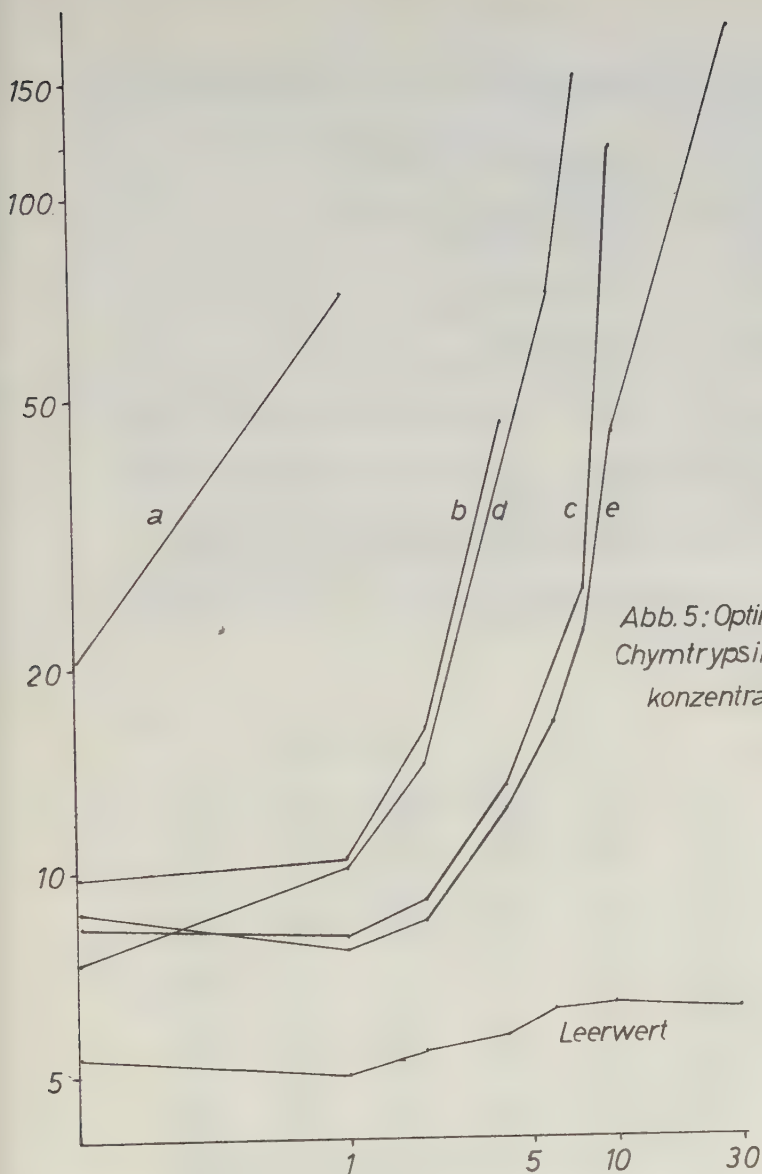


Abb. 5: Optimale
Chymotrypsin-
konzentration

Abcisse: log. der Incubationszeiten in Minuten

Ordinate: log. der Thrombinzeiten in Sekunden

$a=0,1$ $b=0,05$ $c=0,025$ $d=0,001$ $e=0,0005$ gamma/ml

Von diesen Stammlösungen wurden folgende Inhibitormischungen hergestellt:

A) NaCl (= Leerwerte)

B) Trasyolol Stammlösung
B/10) " 1/10 Stammlösung

C) AMCHA Stammlösung
C/10) " 1/10 Stammlösung

D) ACS Stammlösung
D/10) " 1/10 Stammlösung

E) Trasyolol + AMCHA Stammlösungen zu gleichen Teilen
E/10) " " 1/10 " " " "

F) Trasyolol + ACS Stammlösungen zu gleichen Teilen
F/10) " " 1/10 " " " "

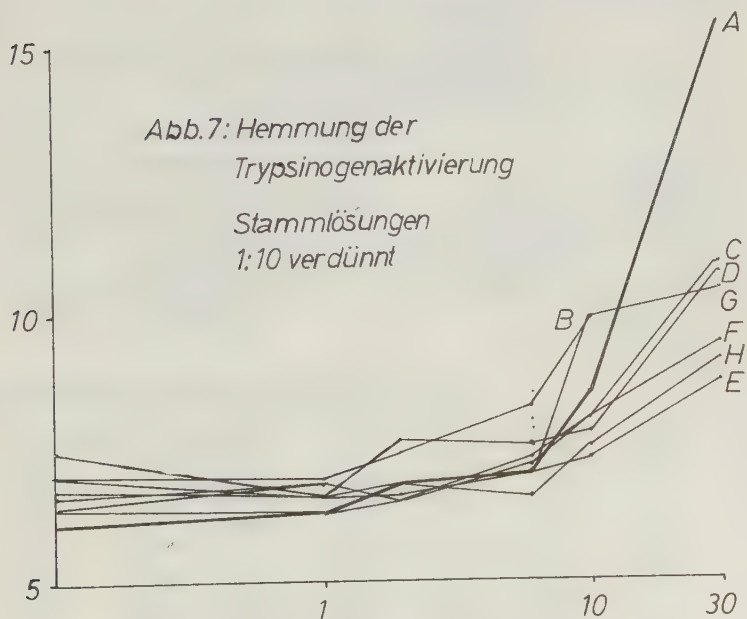
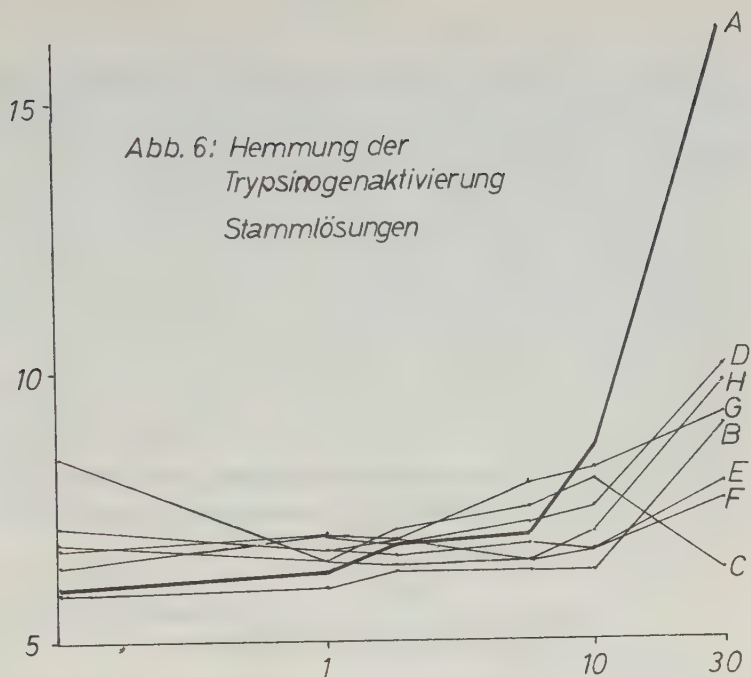
G) AMCHA + ACS Stammlösungen zu gleichen Teilen
G/10) " " 1/10 " " " "

H) Trasyolol+ACS+AMCHA Stammlösungen zu gleichen Teilen
H/10) " " " 1/10 " " " "

Ergebnisse:

Ansatz	Incubationszeit					
	0 ^h	1 ^h	2 ^h	6 ^h	10 ^h	30 ^h
A)	6,1"	6,3"	6,8"	7,0"	8,6"	16,4"
B)	5,9"	6,0"	6,3"	6,3"	6,3"	9,0"
B/10)	6,7"	6,6"	6,7"	7,0"	9,8"	---
C)	8,4"	6,5"	7,1"	7,5"	8,0"	6,4"
C/10)	6,6"	6,8"	6,6"	7,2"	8,0"	10,9"
D)	6,8"	7,0"	6,8"	7,1"	7,4"	10,1"
D/10)	7,4"	6,5"	7,7"	7,6"	7,8"	10,7"
E)	7,1"	6,7"	6,9"	6,6"	6,7"	7,9"
E/10)	6,5"	6,7"	6,5"	7,2"	7,3"	8,7"
F)	6,4"	6,6"	6,6"	6,8"	6,6"	7,7"
F/10)	6,5"	6,3"	6,5"	7,1"	8,0"	9,3"
G)	6,4"	7,0"	6,9"	7,9"	8,1"	9,2"
G/10)	7,1"	6,9"	7,4"	8,3"	9,8"	10,3"
H)	6,8"	6,5"	6,4"	6,5"	7,0"	9,8"
H/10)	7,1"	6,4"	6,8"	6,7"	7,4"	9,1"

Abbildungen 6 und 7



Abcisse: log. der Incubationszeiten in Minuten

Ordinate: Thrombinzeiten in Sekunden

Es wird also die Wirkung des Gemisches durch die Inhibitoren recht ordentlich gehemmt. Zur Bewertung dieser Frage kommen in erster Linie die Werte nach einer Incubationszeit von 30' in Frage, da der Leerwert nur zögernd ansteigt. Es zeigt sich, daß von den reinen Inhibitoren e-ACS in allen Konzentrationen am schlechtesten hemmt. Unter den Inhibitorkombinationen hemmen alle Gemische, die Trasylol enthalten, sehr gut, während Mischungen, die sowohl AMCHA als auch ACS enthalten, vergleichsweise schlecht wirken. Gibt man zur Mischung AMCHA + ACS noch Trasylol hinzu, so bessert sich der Effekt zwar wieder etwas, erreicht aber die früheren Werte nicht wieder.

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob die Inhibitoren auch die Entstehung von Trypsin aus Trypsinogen unter der Katalyse von a-Chymotrypsin hemmen.

Ansatz:	
Gruppe I	Gruppe II
<u>0,50 ml Trypsinogen 1 mg/ml</u>	
0,20 ml Inhibitoren	
A - H wie oben	
<u>0,05 ml a-Chymotrypsinogen 5 gamma/ml</u>	
<u>48 h bei + 4⁰C incubieren</u>	
	0,20 ml Inhibitoren
	A - H wie oben
0,20 ml Rinderf ^g gen 0,6 %	0,20 ml Rinderf ^g gen 0,6 %
0,10 ml Gemisch siehe oben	0,10 ml Gemisch siehe oben
<u>nach verschiedenen Incubationszeiten:</u>	
0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (ROCHE)	0,10 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (ROCHE)
Ergebnisse:	
Gemisch	I N C U B A T I O N S Z E I T E N
	0' 2' 5' 10' 30' 0' 2' 30'
A)	6,8" 6,4" 7,1" 7,3" gr. 300" 7,1" 7,9" 15,1"
B)	5,4" 5,5" 5,6" 5,6" 7,2" 6,4" 7,1" 6,9"
C)	5,8" 5,7" 6,0" 5,8" 7,1" 6,3" 6,6" 8,2"
D)	5,8" 5,8" 8,4" 8,0" 16,1" 6,8" 6,7" 12,1"
E)	6,0" 5,9" 6,7" 6,0" 6,3" 6,0" 5,6" 6,8"
F)	5,6" 6,8" 6,3" 5,8" 6,9" 6,7" 6,5" 7,6"
G)	6,9" 6,3" 7,0" 7,2" 9,7" 6,4" 7,2" 13,9"
H)	6,3" 6,2" 6,4" 5,9" 6,4" 7,1" 6,5" 8,0"

Ergebnisse:

Trypsin in mg/ml	Incubationszeiten:				
	0'	5'	10'	20'	30'
0,01	7,8"	8,2"	8,5"	8,2"	8,0"
0,02	7,2"	8,6"	8,9"	9,4"	9,6"
0,03	7,5"	8,8"	9,3"	11,5"	14,7"
0,04	7,0"	9,7"	10,9"	21,0"	33,9"
0,05	7,0"	10,5"	12,5"	38,2;	67,0"

Abbildung 8

2) Hemmung der Trypsinwirkung durch AMCHA:

Ansatz: 0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 %
 0,10 ml Veronal-Acetat-Puffer pH 7,2
 0,05 ml AMCHA versch. Konz. oder NaCl (Leerwert)
 0,05 ml Trypsin 15 gamma/ml
 nach verschiedenen Incubationszeiten:
 0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (ROCHE)

Ergebnisse:

AMCHA in mg/ml	Incubationszeiten:				
	0'	5'	10'	20'	30'
0 (Leerwert)	7,1"	13,5"	15,8"	18,9"	40,5"
1,000	6,4"	8,5"	11,4"	11,1"	7,0"
0,500	8,1"	9,6"	10,6"	10,6"	8,4"
0,100	7,9"	9,9"	9,5"	10,0"	7,2"
0,050	8,1"	10,7"	12,7"	7,6"	7,0"
0,025	6,6"	7,3"	12,8"	6,7"	5,6"

Abbildung 9

Die resultierenden Kurven zeigen ein Wirkungspessimum für hohe Inhibitorkonzentrationen bei 10 - 20', für niedere Inhibitorkonzentrationen bei 5 - 10'. Dafür gibt es zwei Erklärungs¹möglichkeiten:

- Die Inhibitoren entfalten ihre optimale Wirkung erst nach einer gewissen Latenzzeit.
- Nach 30' bei hohen Konzentrationen und nach 20' bei niederen Konzentrationen setzt eine starke Antitrypsinentwicklung ein, die die Inhibitorwirkung verstärkt, so daß die entsprechenden Werte wieder absinken.

Abb. 8: Wirkung von Trypsin
auf Fibrinogen

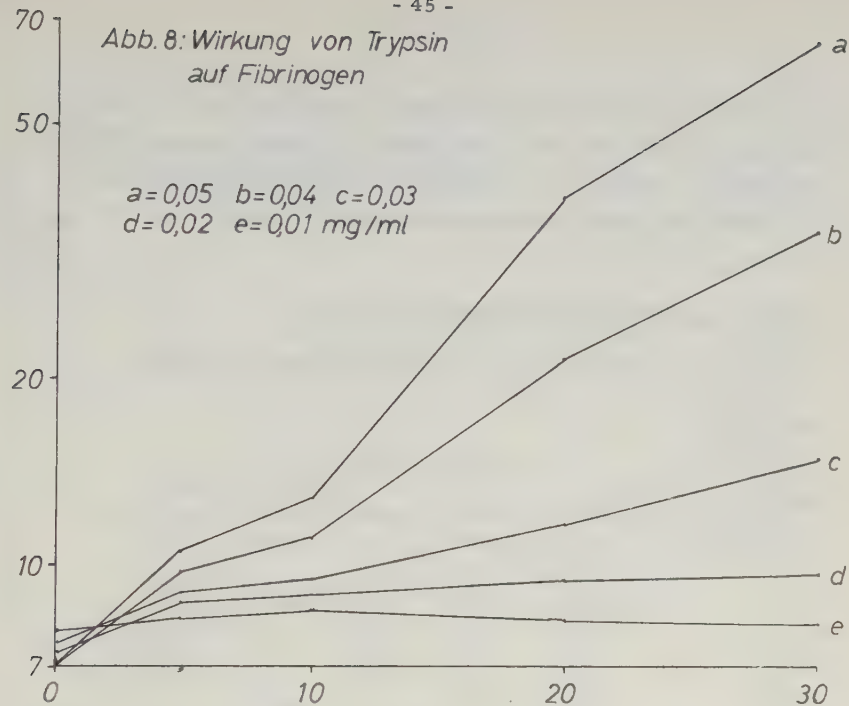
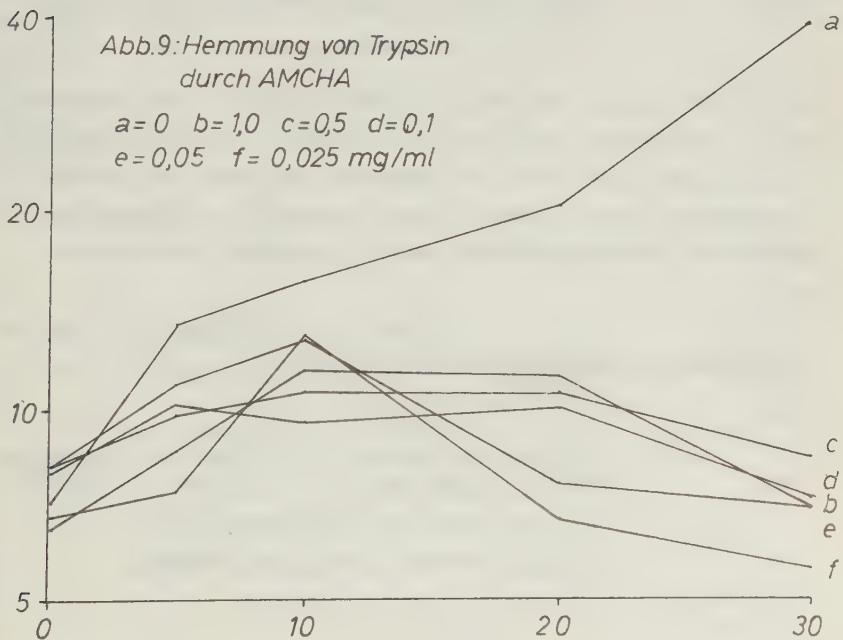


Abb. 9: Hemmung von Trypsin
durch AMCHA



Abzisse: Incubationszeiten in Minuten

Ordinate: log. der Thrombinzeiten in Sekunden

Auf jeden Fall bleibt aber bemerkenswert, daß so niedere Konzentrationen an Inhibitor, wie 0,025 mg/ml (2,5 mg%) optimale Hemmungswirkung zeigen. Eine ähnlich starke Inhibitorwirkung entfaltet AMCHA erst wieder bei Konzentrationen im Bereich von 1,0 mg/ml (0,1 g%).

3) Hemmung der Trypsinwirkung durch ACS:

Ansatz: wie 2) jedoch nur 7 gamma/ml Trypsin (0,7 mg%)

Ergebnisse:

ACS in mg/ml	Incubationszeiten:				
	0'	5'	10'	20'	30'
0 (Leerwert)	11,5"	15,0"	22,6"	27,0"	34,3"
5,0	11,0"	10,1"	20,6"	15,4"	25,3"
2,5	10,7"	13,9"	17,6"	20,0"	25,0"
0,5	9,7"	16,2"	16,5"	12,0"	27,0"
0,25	9,9"	11,7"	13,4"	12,2"	24,4"
0,125	10,9"	14,0"	16,2"	17,0"	23,2"
0,025	10,2"	14,3"	15,5"	16,6"	21,6"

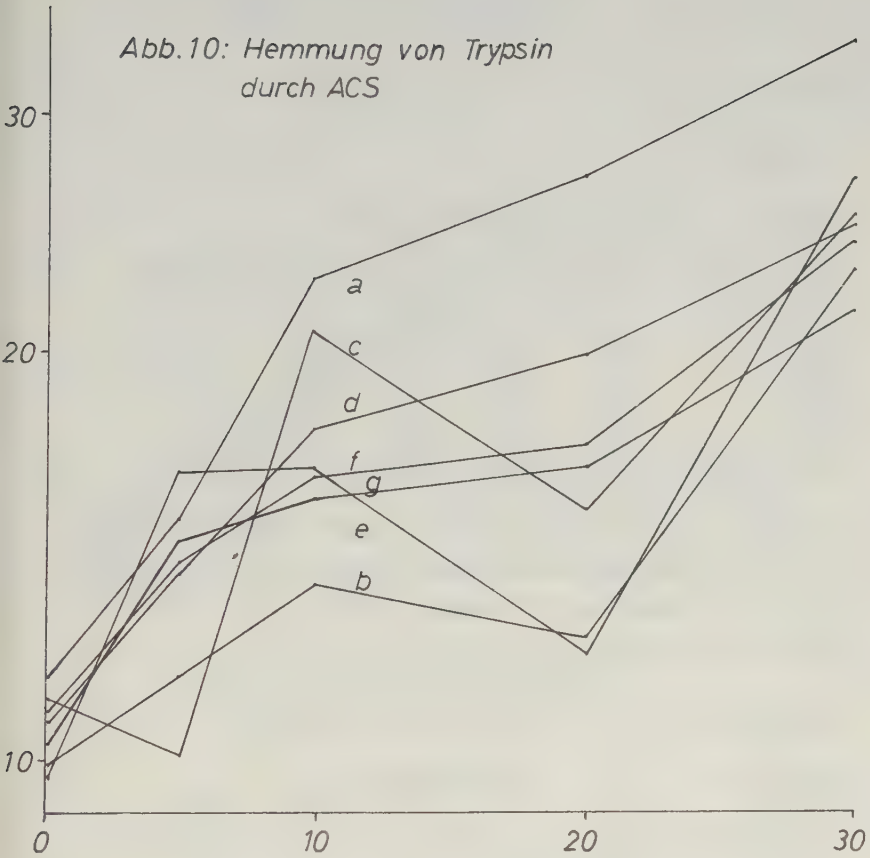
Abbildung 10

Auch ACS hemmt also die Trypsinwirkung, wenn auch nicht annähernd so gut, wie AMCHA. Wiederum hemmen niedere Konzentrationen besser, als hohe. Ein Optimum der Inhibitorwirkung liegt bei der Konzentration von 0,025 mg/ml (2,5 mg%), ein ähnliches Optimum ist erst wieder bei Konzentrationen um 5,0 mg/ml (0,5 g%) zu erwarten.

D) Wirkung der Inhibitoren auf a-Chymotrypsin:

Ansatz: 0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 %
 0,10 ml Veronal-Acetat-Puffer pH 7,2
 0,05 ml NaCl (Leerwert) oder Inhibitoren versch. Konz.
 0,05 ml a-Chymotrypsin 0,02 mg/ml
 nach verschiedenen Incubationszeiten:
 0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (ROCHE)

Abb.10: Hemmung von Trypsin
durch ACS



Abcisse: Incubationszeiten in Minuten

Ordinate: log. der Thrombinzeiten in Sekunden

a=Leerwert c=5,0 d=2,5 e=0,5
b=0,25 f=0,125 g=0,025 mg/ml

Ergebnisse:

1) ACS:

ACS in mg/ml	Incubationszeiten:				
	0'	5'	10'	20'	30'
Leerwert 0	7,2"	13,0"	15,4"	26,3"	61,3"
5,000	7,3"	12,8"	15,0"	22,8"	30,9"
2,500	7,5"	13,3"	13,5"	19,4"	64,2"
0,500	8,3"	16,2"	15,7"	23,9"	37,4"
0,250	7,4"	8,0"	13,0"	17,0"	44,0"
0,125	7,4"	13,1"	15,0"	26,2"	36,8"
0,025	7,1"	11,6"	12,6"	22,8"	16,0"

Abb. 11

Ein Effekt auf die Fibrinogenverdauung durch α -Chymotrypsin ist also kaum vorhanden und wenn schon, dann eher bei niederen Konzentrationen. Aber auch hier kann die Verlängerung der Thrombinzeiten kaum als signifikant angesprochen werden.

2) AMCHA:

AMCHA in mg/ml	Incubationszeiten:				
	0'	5'	10'	20'	30'
Leerwert 0	11,5"	18,0"	24,8"	32,2"	52,9"
1,000	10,4"	17,6"	19,4"	24,2"	37,2"
0,500	11,5"	18,9"	19,1"	28,4"	41,1"
0,100	11,9"	21,9"	24,6"	27,2"	26,0"
0,050	11,0"	18,7"	21,3"	27,5"	42,8"
0,025	13,8"	21,4"	25,1"	28,7"	34,2"

Abb. 12

Auch mit AMCHA kann die Fibrinogenverdauung durch α -Chymotrypsin nicht wesentlich besser gehemmt werden. Signifikant ist die Thrombinzeitverlängerung noch am meisten bei der Konzentration von 1,000 mg/ml (0,1 g%) und für die Incubationszeit von 30' auch für die anderen niederen Konzentrationen.

Abb. 11: Hemmung von Chymotrypsin
(BOEHRJNGER) durch ACS

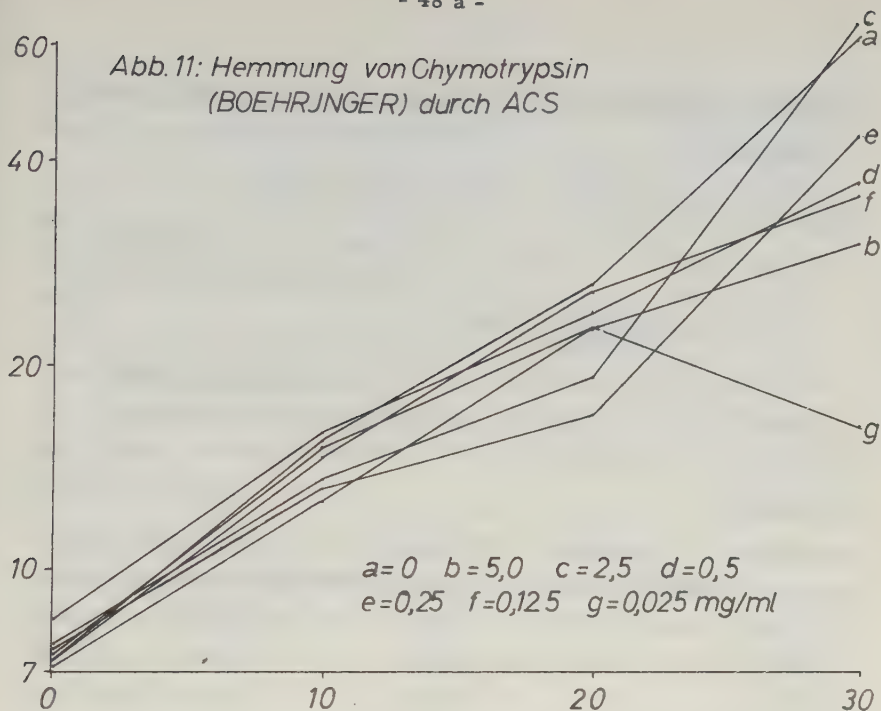
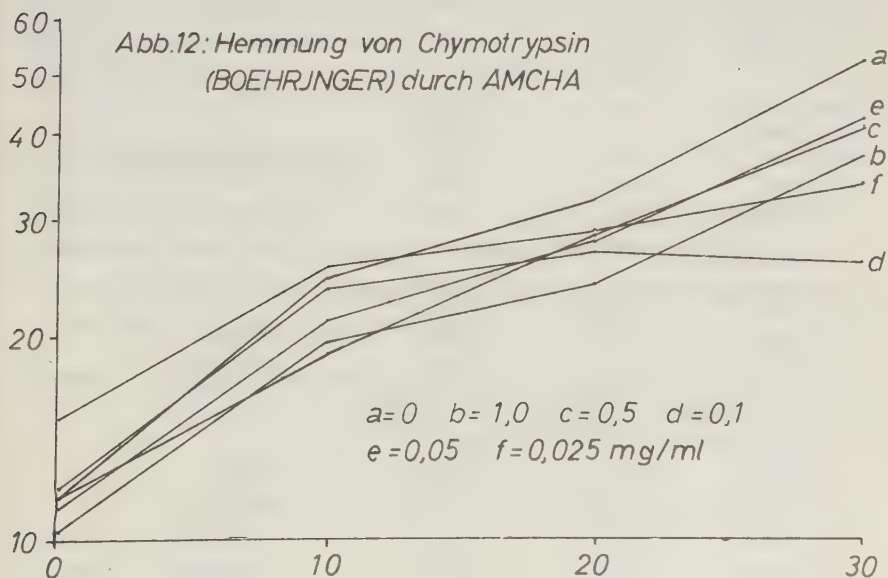


Abb. 12: Hemmung von Chymotrypsin
(BOEHRJNGER) durch AMCHA



Abscissen: Incubationszeiten in Minuten

Ordinaten: log. der Thrombinzeiten in Sekunden

E) Einfluß der Inhibitoren auf die trypsin- und chymotrypsininduzierte

Caseinolyse:

- Ansatz: 1) Caseinplatten: 20 ml Phosphatpuffer pH 7,5
 200 mg Caseinum purum (MERCK)
 500 mg Reinagar (BEHRINGWERKE)
- 2) Beschickung der Löcher:
 0,05 ml Proteolyticum in versch.
 Konz. (BOEHRINGER)
 0,05 ml Inhibitoren oder NaCl

Ergebnisse:

Proteolyt.	Inhibitor	Trypsin	Chymotrypsin
Konzentration		Lysishöfe	in mm
1,000 mg	----	23,0	20,5
0,500 mg	----	22,5	19,5
0,250 mg	----	22,0	18,5
0,100 mg	----	19,0	17,5
0,050 mg	----	18,0	15,5
0,010 mg	----	17,0	14,5
0,005 mg	----	16,0	13,5
Trasytol mg/ml			
1,0 mg	0,40	19,0	19,5
1,0 mg	0,20	20,0	19,5
1,0 mg	0,10	21,0	18,5
1,0 mg	0,05	22,0	18,5
1,0 mg	0,01	23,0	18,5
AMCHA mg/ml			
1,0 mg	2,00	22,0	18,5
1,0 mg	1,00	22,0	19,5
1,0 mg	0,50	22,0	18,5
1,0 mg	0,25	22,0	18,5
1,0 mg	0,05	21,0	19,5
ACS mg/ml			
1,0 mg	10,00	21,0	18,5
1,0 mg	5,00	21,0	18,5
1,0 mg	1,00	22,0	18,5
1,0 mg	0,50	22,0	18,5
1,0 mg	0,25	22,0	18,5

Ergebnisse:

AMCHA in mg/ml	Incubationszeiten:				
	0'	5'	10'	20'	30'
Leerwert 0	9,6"	11,6"	11,9"	14,9"	17,0"
5,00	8,9"	9,7"	11,1"	12,9"	12,4"
2,00	8,4"	11,9"	12,0"	11,1"	9,5"
1,00	8,5"	9,9"	11,0"	12,0"	11,4"
0,50	8,5"	9,3"	9,8"	11,2"	11,4"
0,25	8,6"	9,8"	10,6"	11,4"	10,1"
0,10	8,3"	10,8"	11,5"	12,6"	10,0"
0,05	8,5"	9,3"	10,8"	11,8"	10,7"

Abbildung 13

Es läßt sich hier eine deutliche Hemmung der α -Chymotrypsinwirkung, besonders bei Incubationszeiten von 30' ablesen. Die Verunreinigung von α -Chymotrypsin CHOAY mit Trypsinspuren spielt hierbei sicher eine Rolle, wenn sie auch die Abweichung gegenüber den Werten mit α -Chymotrypsin BOEHRINGER nicht völlig erklären kann. Die Ansätze waren bei den Versuchen mit CHOAY-präparaten nicht gepuffert, jedoch wurde der pH jeweils mit Indikatorpapier überprüft und lag immer um den Neutralpunkt herum. AMCHA erscheint also ungeachtet der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Inhibitorwirkung gegenüber den beiden α -Chymotrypsinpräparaten ein gutes Antidot für α -Chymotrypsin CHOAY darzustellen.

Trasylol:

Ansatz: siehe umseitig, nur statt AMCHA Trasylol

Ergebnisse:

Trasylol in mg/Ansatz	Incubationszeiten:				
	0'	1'	2'	5'	10'
Leerwert 0	4,9"	6,6"	6,8"	8,1"	17,3"
0,02	5,1"	5,4"	5,8"	7,6"	6,7"
0,01	4,1"	5,1"	5,0"	4,9"	5,9"

Abbildung 14

Vor allem bei einer Konzentration von 0,02 mg/ml Trasylol kann eine ausgezeichnete Hemmwirkung von Trasylol abgelesen werden.

Abb.13: Hemmung von Chymotrypsin
(CHOAY) durch AMCHA

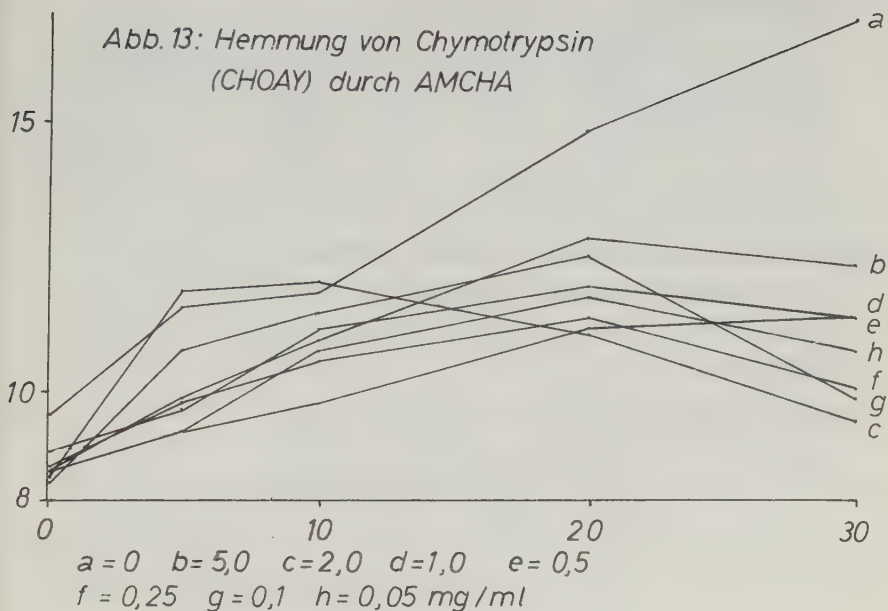
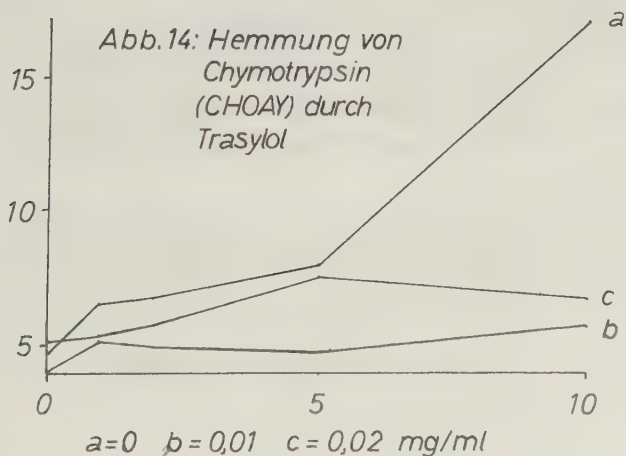


Abb.14: Hemmung von
Chymotrypsin
(CHOAY) durch
Trasylol



Abcisse: Incubationszeiten in Minuten

Ordinate: Thrombinzeiten in Sekunden

G) Angriffspunkt des a-Chymotrypsins:

a-Chymotrypsin hat als proteolytisches Ferment die Eigenschaft, Eiweißkörper abzubauen und damit zu inaktivieren. In den in den vorigen Versuchen geprüften Ansätzen sind aber grundsätzlich zwei Eiweißkörper vorhanden: Fibrinogen und Thrombin. Eine Verlängerung der Thrombinzeit kann aber entweder auf der Verminderung der Fibrinogenkonzentration oder auf einer Verringerung der agierenden Thrombinmenge beruhen. Es soll daher in einem Zusatzversuch überprüft werden, an welcher der beiden Komponenten a-Chymotrypsin vorwiegend angreift.

1) Wirkung auf Fibrinogen:

Ansatz: 0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 %
0,10 ml Veronal-Acetat-Puffer pH 7,2
0,05 ml NaCl
0,05 ml a-Chymotrypsin (BOEHRINGER) versch. Konz.
nach verschiedenen Incubationszeiten:
0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (ROCHE)

Ergebnisse:

Chymotryps. in mg/ml	Incubationszeiten				
	0'	5'	10'	20'	30'
0,100	10,9"	25,7"	gr. 2'	gr. 2'	gr. 2'
0,025	9,0"	13,7"	17,7"	27,6"	40,5"
0,010	8,8"	12,1"	13,0"	16,5"	18,8"

2) Wirkung auf Thrombin:

Ansatz: 0,20 ml Thrombin 10 NIH-E/ml (ROCHE)
0,10 ml Veronal-Acetat-Puffer pH 7,2
0,05 ml NaCl
0,05 ml a-Chymotrypsin (BOEHRINGER) versch. Konz.
nach verschiedenen Incubationszeiten:
0,20 ml Rinderfibrinogen 0,6 %

Ergebnisse:

Chymotryps. in mg/ml	Incubationszeiten				
	0'	5'	10'	20'	30'
0,100	7,0"	8,1"	11,4"	29,9"	gr. 2'
0,025	7,6"	8,2"	8,0"	14,2"	44,2"
0,010	7,5"	7,0"	7,4"	16,9"	42,5"

Zunächst muß festgestellt werden, daß a-Chymotrypsin tatsächlich beide Eiweißkörper angreift. Es zeigt sich aber ein Unterschied im Reaktionsmechanismus gegenüber den beiden Substanzen: Während Fibrinogen sofort, d. h. auch nach kurzen Incubationszeiten recht erheblich zerstört wird, kommt die Wirkung des Proteolyticums gegenüber Thrombin erst nach längeren Incubationszeiten (20') zum Tragen. In niederen Konzentrationen wirkt a-Chymotrypsin dann allerdings auf Thrombin stärker als auf Fibrinogen. Eine Thrombinzeitverlängerung bei Versuchen, bei denen sowohl Fibrinogen und Thrombin verwendet werden und die durch die Einwirkung von a-Chymotrypsin auf beide Substanzen ausgelöst wird, ist also immer auf die Zerstörung beider Eiweißkörper zurückzuführen. Die Zerstörung des Thrombins macht sich allerdings erst bei Thrombinzeiten über 10' signifikant bemerkbar. Da in den vorliegenden Versuchen aber Thrombinzeitverlängerungen immer nur bis zu einer Verlängerung auf 2' gemessen wurden, sind sie in jedem Fall fast ausschließlich einer Irridation des Fibrinogens und nur in verschwindendem Maße einer Irridation des Thrombins zuzuschreiben.

Immerhin scheint mir aber die Verdauung von Thrombin durch a-Chymotrypsin bedeutungsvoll, da sich a-Chymotrypsin ja reichlich im Duodenum findet. Eine perorale Verabreichung von Thrombin, etwa zur Blutstillung bei blutenden Duodenalulcera, erscheint daher wertlos, solange nicht gleichzeitig die a-Chymotrypsinaktivität in diesem Darmabschnitt unterbunden wird, wie das von MARX schon des öfteren empfohlen wurde. Zudem wird das Thrombin schon im Magen durch die dort vorhandenen Peptidasen und HCl recht erheblich vorgeschädigt, so daß nur noch eine klägliche Restaktivität in das Duodenum gelangt. Neben einer Pufferung des Magensaftes scheint eine gleichzeitige Verabfolgung von Inhibitoren des a-Chymotrypsins und des Trypsins zweckmäßig.

Versuche in vivo:

Nachdem die Inhibitoren in vitro gute Hemmwirkung zeigten, wurden diese Hemmwirkung und die Verweildauer in vivo überprüft. Als Versuchstiere dienten Kaninchen.

Nachweismethoden:

Es wurden grundsätzlich zwei Gruppen von Nachweismethoden angewandt:

1) Vollbluttests: Dabei wurden jeweils 0,30 ml Citratblut mit 0,06 ml CaCl_2 versetzt und die Lysiszeit im Uhlenhuthröhrchen und im TEG bestimmt. Diese Methode kommt den Vorgängen in vivo am nächsten, wobei wieder die Lysiszeit im Uhlenhuthröhrchen genauer ist (siehe Methodik) - im TEG werden schwache Gerinnsel leicht zerrissen und nicht mehr registriert, während sie im Uhlenhuthröhrchen durchaus noch erfaßt werden können.

2) Misch-Plasma-Serum-Fibrinolysetest: Auch dieser Test wurde im Reagensglas und im TEG durchgeführt. Wieder sind die Werte im TEG ungenauer. Dieser Test gibt nur bedingt Auskunft über die Vorgänge in vivo, ist aber zur Ermittlung der grundsätzlichen Vorgänge recht nützlich.

Zeitliche Versuchsanordnung:

Wenn dem Tier Streptokinase injiziert wurde, so erfolgte das nach Entnahme von Blut zur Citratblutherstellung für den Leerwert zum Zeitpunkt - 2'. Sodann wurde der SK-Leerwert festgestellt (Blutentnahme) und zum Zeitpunkt 0' der Inhibitor gespritzt. Von diesem Punkt an wurden in wachsenden Abständen Blutproben entnommen. Zur Citratblutherstellung wurden 4 Teile Blut mit 1 Teil Natriumcitrat 3,8 % gemischt (mehrmaliges Stürzen der Spritze). Sodann wurde Citratblut für die Nachweismethoden 1) weggenommen und der Rest zur Abtrennung der zellulären Elemente 10' bei 3.000 UPM zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde sofort ausgetestet.

Versuchsserie I:

Gruppe 1: 5 Kaninchen (3.750 - 5.050 g) wurden zwischen 10.000 und 20.000 E Streptokinase (Streptase BEHRINGWERKE) und anschließend je 50 mg AMCHA gespritzt. Nach Versuchsende wurden den Tieren nochmals zwischen 4.000 und 6.000 E SK appliziert, um nähere Auskunft über die Restamplitude des TEG zu erhalten.

A) **Verträglichkeit:** Die applizierten Proteolyticums- und Inhibitormengen wurden, trotz Blutentnahmen bis zu 22 ml / Versuchstier gut vertragen. Jedes Tier wurde nur einmal verwendet, um Sensibilisierungserscheinungen auszuschließen, desgleichen wurde kein Tier verwendet, das schon einmal mit Anticoagulantien, Proteolytica oder Inhibitoren in Berührung gekommen war.

B) Inhibitoréffekt:

a) **Vollbluttests:** Nach Zugabe von Streptokinase lösten sich die Vollblutgerinnsel im Reagensglas und TEG regelmäßig innerhalb 25 - 30'. Die Lysiszeit verlängerte sich nach Inhibitorgabe bis zu 120' nach der Injektion auf über 18 - 48 Stunden. Die erneuten Streptokinasegaben änderten daran nichts, lediglich im TEG wurde eine geringe Verschmälerung nach erneuter SK-gabe beobachtet.

Diese Tests lassen die Aussage zu, daß die SK-induzierte Fibrinolyse durch AMCHA abgestoppt werden kann. Die Verschmälerung des TEG nach 120' läßt vermuten, daß nach dieser Zeit auch das Fibrinolytische Potential abgenommen hat, daß aber noch eine geringe Restaktivität des Inhibitors vorhanden ist.

b) Misch-PSF:

Durch die Vorlage von SK im Reaktionsgemisch wurde hier dafür gesorgt, daß ständig ein fibrinolytisches Potential vorhanden war. Dieser Test läßt also eine Aussage über die Verweildauer des Inhibitors im Organismus zu.

Ansatz: 0,04 ml CaCl_2 1,29 %
 0,05 ml Humanserum 1:1
 0,05 ml SK
 0,10 ml Humanplasma
 0,10 ml Hasenplasma

Es ergaben sich typische Kurvenverläufe.

Bei vorsichtiger Wertung muß der Leerwert ohne SK-gabe beim Kaninchen als Grundwert dienen. Danach beträgt die Verweildauer von AMCHA in Versuch 1,2 und 5 120', in Versuch 3 15' und in Versuch 4 nicht auswertbar. Die nach 120' noch vorhandenen Inhibitormengen sind aber so geringfügig, daß sie durch die erneute SK-gabe in jedem Fall unterdrückt werden.

Versuchsdaten: siehe Tabelle

Blutprobe	Versuch No.				
	1	2	3	4	5
Leer	24-48 h	7'05"	15'	gr. 18 h	15'40"
SK (1)	3'44"	5'40"	Ø	18'	5'35"
5'	24-48 h	gr. 48h	gr. 24h	gr. 18h	gr. 48h
15'	gr. 48 h	gr. 48h	18-24h	----	gr. 48h
30'	gr. 48 h	11'45"	15'23"	gr. 18h	120'
60'	gr. 48 h	11'30"	14'34"	gr. 18h	46'
90'	gr. 48 h	----	12'51"	gr. 18h	----
120'	gr. 48 h	9'48"	10'14"	gr. 18h	30'
SK (2)	----	5'54"	Ø	10'	5'14"

Ø = keine Gerinnung

Gruppe 2: 3 Hasen (4.750 - 6.700 g) wurden je 20 mg AMCHA/kg Körpergewicht injiziert, jedoch ohne vorherige SK-gabe.

A) Verträglichkeit: Trotz Blutentnahmen bis zu 22 ml pro Versuchstier vertrugen alle Tiere die injizierte Menge Inhibitor ohne weiteres. Jedes Tier war zum ersten Mal zu Versuchszwecken verwendet worden.

B) Verweildauer: Es wurde nur mit dem Misch-PSF gearbeitet, bei dem im Reaktionsgemisch für ein konstantes fibrinolytisches Potential gesorgt wurde. Die Werte sind also als Mindest-verweildauerwerte anzusehen.

Ansatz: 0,10 ml Humanplasma
 0,05 ml Humanserum 1:1
 0,05 ml SK
 0,10 ml Hasenplasma
 0,04 ml CaCl_2 1,29 %

Ergebnisse:

Blutprobe	Versuch No.		
	1	2	3
Leerwert	7'48"	5'33"	5'10"
0'	gr. 2 h	gr. 2 h	gr. 2 h
5'	gr. 2 h	gr. 2 h	gr. 2 h
15'	gr. 2 h	gr. 2 h	gr. 2 h
30'	105'	17'04"	gr. 2 h
60'	21'45"	12'21"	10'34"
90'	12'38"	8'35"	11'51"
120'	10'17"	6'47"	9'48"
180'	---	6'30"	5'05"

Die Werte stellen jeweils Mittelwerte aus 3 Parallelbestimmungen dar. Es ergibt sich ein typisches Verweildauerprofil. Die Kurve steigt sofort steil an, um nach etwa 30' wieder in den meßbaren Bereich abzusinken. Der Inhibitor bleibt aber noch bis 120' nach der Injektion gut nachweisbar und ist nach 180' vollständig eliminiert.

Versuchsserie II:

Gruppe 1: 3 Kaninchen (4.750 - 5.100 g) wurde jeweils 1 Ampulle Plasminmischinhibitor comp. (10 ml) (BAYER 3472), der je Ampulle 0,2 g Trasylol + 1 g ACS enthält, injiziert. Es wurde keine SK vorgegeben.

A) Verträglichkeit: Trotz der relativ hohen Dosierung immer ausgezeichnete Verträglichkeit, auch bei Blutentnahmen bis zu 20 ml / Versuchstier.

B) Verweildauer: Es wurde wieder nur der Misch-PSF verwendet, bei dem ein konstantes fibrinolytisches Potential vorgegeben wird. Die Werte sind also wieder als Mindestwerte anzusehen.

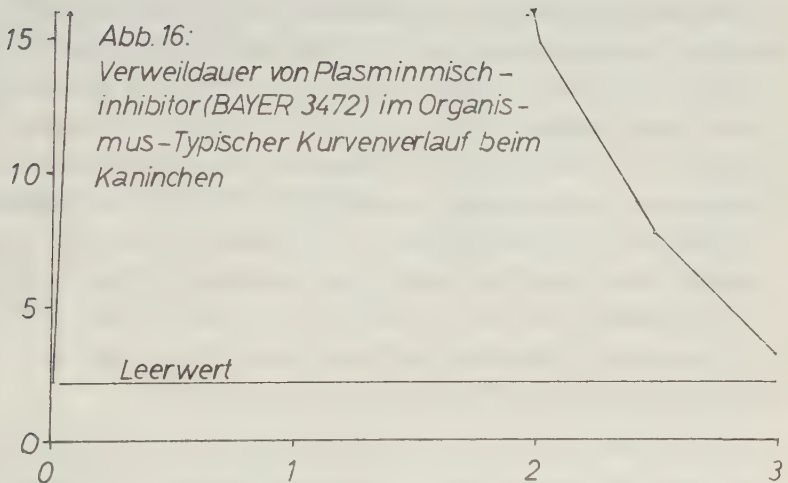
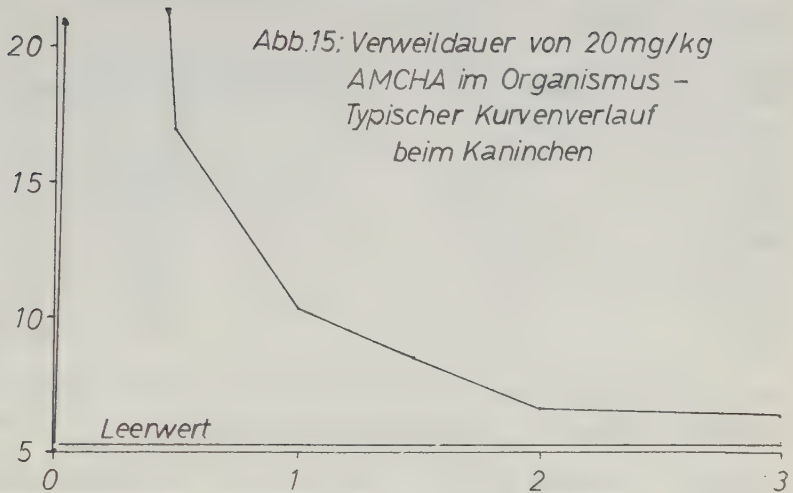
Ansatz: wie Serie I/Gruppe 2

Zeit	Versuchstier No.		
	1	2	3
Leerwert	1' 58"	2' 10"	1' 59"
0'	gr. 15'	gr. 15'	gr. 15'
15'	gr. 15'	gr. 15'	gr. 15'
30'	gr. 15'	gr. 15'	gr. 15'
60'	gr. 15'	gr. 15'	gr. 15'
90'	gr. 15'	gr. 15'	gr. 15'
120'	7' 39"	14' 50"	5' 24"
150'	4' 25"	7' 38"	3' 56"
180'	4' 07"	3' 12"	2' 11"

Abbildung 15

Die Werte stellen jeweils Mittelwerte aus 2 - 3 Parallelbestimmungen dar. Es ergibt sich wiederum ein typisches Verweildauerprofil: Die Kurve steigt sofort steil an, um nach 90' wieder in den meßbaren Bereich zurückzukehren. In Versuch 1 und 2 ist nach 180', in Versuch 3 nach 150' noch ein deutlicher Inhibitorspiegel nachweisbar. Die Kurven stimmen in ihrem Verlauf grundsätzlich mit den von HENNIG ermittelten überein, wenn der Inhibitor auch eine längere Verweildauer aufweist, was wahrscheinlich dosisbedingt ist.

TEG: Derselbe Ansatz wurde auch im TEG mitgeschrieben. Es ergaben sich grundsätzlich die gleichen Kurvenverläufe - wie das auch zu erwarten stand, wenn auch die Werte allgemein etwas niedriger lagen, was aber gut durch die gröbere Registrationsmethode zu erklären ist. Trägt man die Amplitude des TEG zu einem gegebenen (beliebigen) Zeitpunkt in ein graphisches System ein, so erhält man ein Amplitudenprofil für diesen Zeitpunkt, das dem oben ermittelten Profil sehr ähnlich ist und - da der Inhibitor die einzige amplitudenwirksame Variable ist - einen direkten Rückschluß auf die Inhibitorwirksamkeit erlaubt. Aus einem Abfall der Amplitude kann man auf einen Abfall der wirksamen Inhibitormenge schließen, wenn diese beiden Größen auch nicht streng proportional sind.



Abcissen: Zeitpunkt der Blutentnahme in Stunden nach der Inhibitorgabe

Ordinaten: Lysiszeiten in Minuten

Maximale Amplitude ($a_{\max.}$) und Fläche nach 35^o der TEG's für Kaninchen I (Gruppe I, Versuchsserie II)

Zeit	$a_{\max.}$ in mm	Fl. 35 ^o in cm ²
Leer 0 ^o	0	0
5 ^o	22,4	11,89
15 ^o	13,5	5,81
30 ^o	12,8	5,92
60 ^o	12,5	6,42
90 ^o	7,0	2,01
130 ^o	3,0	0,64
150 ^o	2,5	0,16
180 ^o	2,5	0,09

Abb. 16 und 17

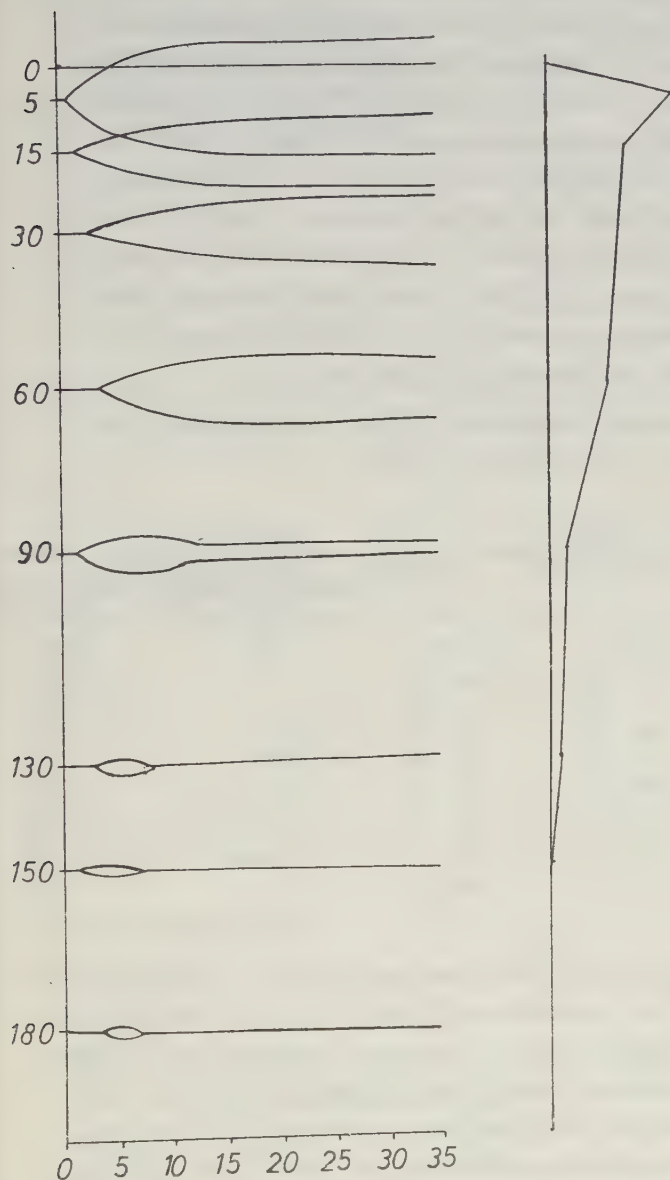
Das Amplitudenprofil nach 35^o, die maximalen Amplituden und die TEG-Flächen bestätigen die oben beschriebenen Ergebnisse.

Gruppe 2: 1 Hase (No. 23) (4.900 g) bekam über 20 Tage hinweg täglich 1 Ampulle (10 ml) Mischinhibitor comp. BAYER 3472 (insgesamt also 4 g Trasylol + 20 g ACS). Keine Streptokinasevorgabe.

A) Verträglichkeit: Auch diese überdimensionale Dosis wurde vom Versuchstier anstandslos vertragen. Es zeigten sich keinerlei Sensibilisierungsercheinungen. Allerdings waren nach 20 Tagen die Ohrvenen des Tieres derart thrombosiert, daß eine Weiterführung des Versuches unmöglich wurde. Das Tier wurde 2 Tage nach Versuchsende aus vollem Wohlbefinden heraus getötet. Nachdem bei diesem Tier über längere Zeit zeitweise die "natürliche Fibrinolyse" unterbunden worden war, schien möglich, daß es unter Umständen in den Gefäßen und auf den serösen Häuten Fibrinablagerungen zeigen würde. Bei der Sektion fanden sich aber nur spiegelglatte Gefäßwände und seröse Häute. Auch sonst konnte an dem Tier kein pathologischer Befund erhoben werden.

B) Verweildauer und Akkumulation: Eine Akkumulation der Inhibitorwirkung wurde für Trasylol von WERLE ausgeschlossen. ACS dagegen kann beim prostataoperierten Menschen nach Beobachtungen von MARX recht erheblich akkumulieren.

Abb.17: TEG und Amplitudenprofil nach 35 Minuten für Kaninchen 1



Abcisse: TEG-laufzeit in Minuten

Ordinate: Zeitpunkt der Blutentnahme in Minuten
nach der Inhibitorgabe

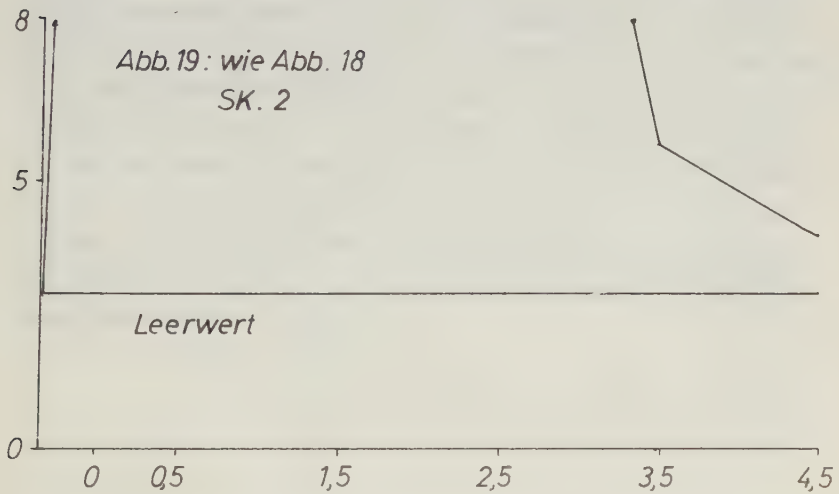
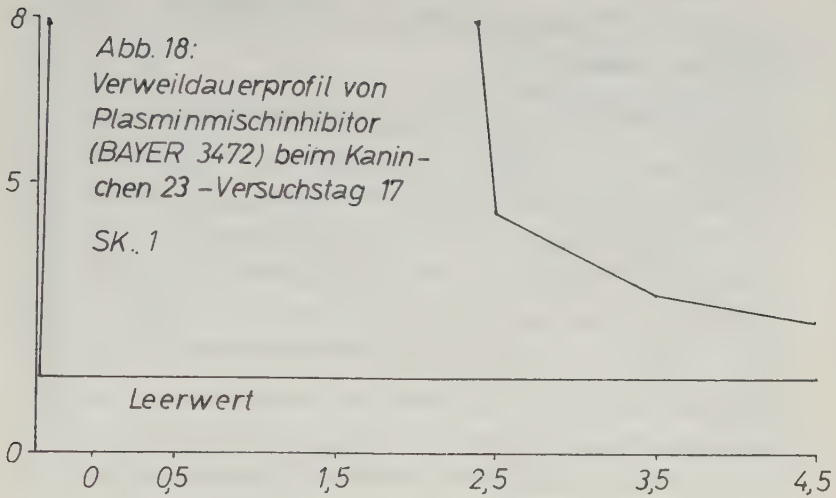
Es wurde im Verlauf des Versuches mehrere Male der Misch-PSF durchgeführt und im TEG mitgeschrieben und zwar immer vor Zugabe des Inhibitors. Bei einem Ausgangswert von 4'40" schwankten die täglichen Leerwerte zwischen 5'13" und 2'02". Diese Schwankungen sind mit dem Aktivitätsverlust der Teststreptokinase und Schwankungen im fibrinolytischen Potential des Humanplasmas (es wurde immer Plasma vom gleichen Probanden - nüchtern - verwendet!) hinreichend erklärbar. Im TEG konnte zumeist überhaupt kein Gerinnsel registriert werden, etwa entstandene Gerinnsel lösten sich sofort wieder auf. Eine Akkumulation trat also beim gesunden Kaninchen mit Sicherheit nicht auf.

Am 17. Versuchstag wurde außerdem ein Verweildauerprofil im Misch-PSF und Misch-PSF-TEG erstellt.

Zeit	SK 1		SK 2	
	Misch-PSF	Misch-PSF	Misch-PSF-TEG	
			a _{max.} in mm	Fl. 22,5' in cm
Leer	1'40"	2'57"	2,4	0,7
0'	gr. 15'	gr. 15'	---	---
5'	gr. 15'	gr. 15'	17,5	3,92
15'	gr. 15'	gr. 15'	21,0	5,41
30'	gr. 15'	gr. 15'	24,0	6,12
60'	gr. 15'	gr. 15'	29,0	7,88
90'	gr. 15'	gr. 15'	25,0	7,04
150'	4'28"	gr. 15'	4,0	1,60
210'	3'00"	5'45"	2,8	0,38
270	2'35"	4'08"	2,1	0,45

Abbildungen 18, 19, 20

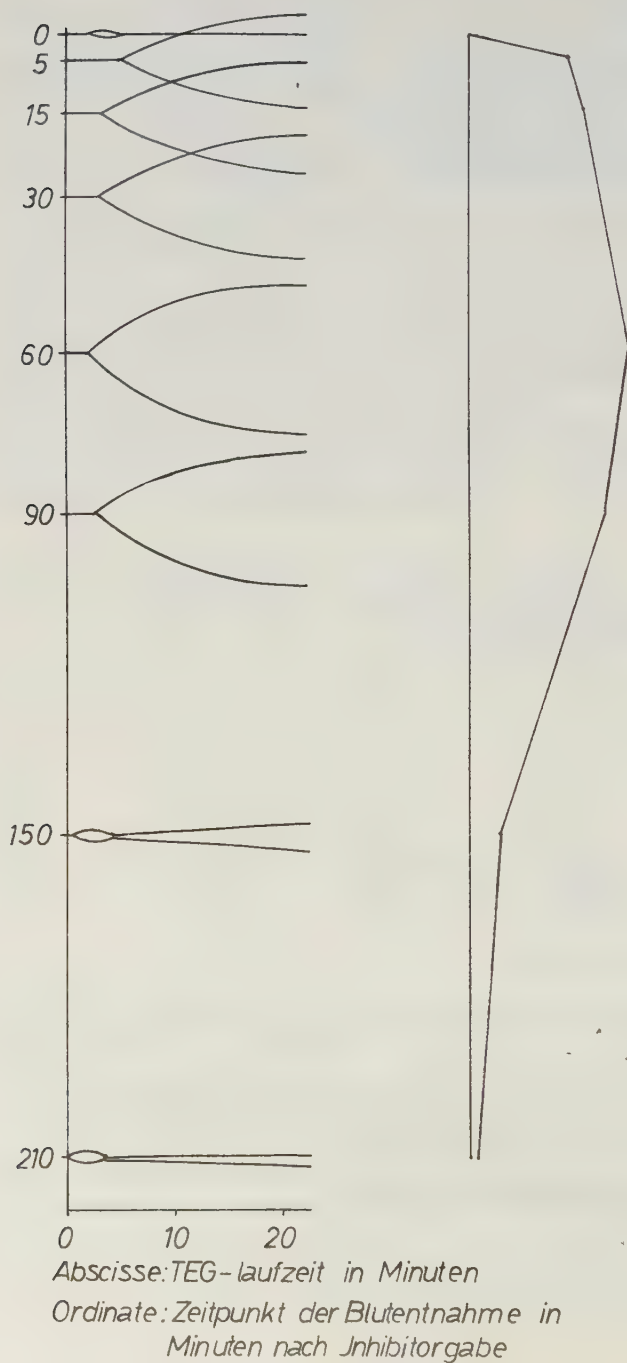
In allen Tests läßt sich eine Verweildauer von 210 - 270' sicher nachweisen. Auch das Amplitudenprofil nach 22,5' zeigt einen gleichsinnigen Verlauf. Mit 270' ist die Verweildauer gegenüber den in Gruppe I/Serie II gewonnenen Werten etwas verlängert. Es erscheint aber nicht gerechtfertigt, von einem Akkumulationseffekt zu sprechen. Vielmehr dürfte die Gewebsabsättigung mit Inhibitor bei den früheren Verweildauerversuchen jeweils einen Teil des Inhibitors verbraucht haben. Nach 17 Tagen ist nun eine vollständige Gewebsabsättigung



Abscissen: Zeitpunkt der Blutentnahme in Stunden
nach der Inhibitorgabe

Ordinaten: Lysiszeiten in Minuten

Abb. 20: TEG und Amplitudenprofil nach 22,5 Minuten für Kaninchen 23 - 17. Versuchstag - SK 2



erreicht und damit wird im Test die gesamte injizierte Menge Inhibitor erfaßt.

In einem Zusatzversuch wurde versucht, die Rolle des Ovomucoidinhibitors zu klären, der bekanntlich im Hühnereiweiß enthalten ist und Trypsin, nicht aber die Fibrinolyse zu hemmen vermag. In befruchtete Hühnereier wurden die drei Inhibitoren eingebracht, in der Absicht, die Wirkung des Ovomucoidinhibitors zu unterstützen und so - nach der üblichen Bebrütung von 21,5 Tagen - am Küken die verstärkte Inhibitorwirkung zu studieren.

Die Applikation der Inhibitoren erfolgte unter sterilen Kautelen. In der Technik der Beimpfung, der Bebrütung und der Eröffnung der Eier und Fixierung der Embryonen hielt ich mich an die Vorschriften von ROMEIS (48).

Nachdem - nach der üblichen Bebrütungszeit von 21,5 Tagen kein Küken spontan ausschlüpfte, wurden die Eier eröffnet. Es zeigte sich, daß die Entwicklung der Embryonen teils überhaupt nicht in Gang kam, teils nach verschieden langer Zeit abgebrochen war. Ob das auf die Einwirkung der Inhibitoren zurückzuführen ist, kann nicht entschieden werden. Immerhin kommt diesen Versuchen erneut größere Bedeutung zu, nachdem MELANDER u. a. (36) festgestellt haben, daß ACS und AMCHA in sehr hohen Dosen bei Maus und Ratte die Fertilität erheblich zu senken vermögen und ACS in der Lage ist, bei der Maus Mißbildungen zu erzeugen.

D i s k u s s i o n :

Vergleicht man die Wirksamkeit der drei untersuchten Inhibitoren: Trasylol, ACS und AMCHA untereinander, so lassen sie sich sofort in zwei Gruppen aufteilen. Die Superadditionswirkung zwischen Trasylol einerseits und ACS und AMCHA andererseits und die fehlende Superadditionswirkung von AMCHA und ACS untereinander machen einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus der beiden Inhibitorgruppen wahrscheinlich. Die Inkonstanz der Dosisrelationen der Inhibitorgruppen untereinander unterbaut diese Theorie.

Trasylol:

Es besitzt in allen Tests eine sehr gute Inhibitorwirksamkeit. Wenn diese Wirksamkeit auch durch alle Stufen der Aktivierung des fibrinolytischen Systemes verfolgt werden konnte, so läßt sich daraus doch noch nicht eindeutig sagen, was nun eigentlich das Substrat für den Inhibitor darstellt. Neben der Möglichkeit der Inaktivierung der Vorstufen des Plasmins und des Plasmins selbst, läßt sich eine andere Möglichkeit nicht ausschließen, nämlich, daß Trasylol die für Plasmin empfindliche Gruppe im Fibrinogen und Fibrin blockiert. Die gleichmäßige Hemmung der Spaltung von Fibrinogen und Fibrin ließe darauf schließen, daß diese "empfindliche Gruppe" schon im Fibrinogenmolekül vorhanden ist und mit in das Fibrinmolekül übernommen wird. Bei allen Versuchen, die eine Hemmung von Plasmin und seinen Vorstufen nachzuweisen versuchen, würde dann Trasylol sofort das Fibrinogen- oder Fibrinsubstrat kompetitiv für das sich gleichzeitig unbehindert bildende Plasmin blockieren. Bei einem direkten Angreifen von Trasylol am Plasmin, müßte man annehmen, daß Plasmin mehrere, verschieden zu blockierende Gruppen fibrinolytischer Aktivität besitzt, da sonst eine Superaddition des Hemmungseffektes bei Kombination verschiedener Inhibitoren nicht mehr erklärbar wäre. Dagegen spricht, daß Trasylol in einem Reaktionsgemisch aus Fibrinogen und Plasmin die Fibrinogenolyse total blockiert. Ich glaube daher, daß Trasylol Fibrinogen und Fibrin als Substrat benutzt.

ACS und AMCHA:

Der ähnliche chemische Aufbau dieser beiden Substanzen läßt eine ähnliche Wirkung von vorneherein vermuten. Für ACS darf ein Angreifen am Plasmin und seinen Vorstufen als gesichert gelten (47). Die entscheidende Rolle für die Tatsache einer Inhibitorwirksamkeit, spielt sicher der Abstand der Amino- von der Carboxylgruppe, der bei beiden Praeparaten mit 7 Å optimal ist. Dieser Abstand stellt gewissermaßen den Schlüssel dar, der ein Angreifen am Substrat überhaupt möglich macht. So erklärt sich auch zwanglos die Beobachtung, daß sich die beiden Inhibitoren in ihrer Wirkung nicht superaddieren können. Die Qualität des Inhibitors hängt aber zweifelsfrei vom Substituenten ab. Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang der Untersuchung von MELANDER u. a. (36) zu, nach der die bislang verwendeten AMCHA-praeparate Gemische zweier AMCHA-isomeren sind, von denen eines antifibrinolytisch völlig inaktiv ist, während das andere eine Substituentenkonfiguration hat, die einen optimalen Hemmungseffekt auf die Fibrinolyse besitzt. Man kann annehmen, daß dieses Isomer grundsätzlich an denselben Stellen wie ACS angreift. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, warum AMCHA im Gegensatz zu ACS in einem Fibrinogenolyseversuch nicht hemmt. Die fibrinolytische Aktion des Plasmins wird dagegen von beiden Substanzen gehemmt. Allerdings ist diese Hemmung nicht optimal in Ansätzen, die nur gereinigtes Fibrinogen enthalten. Sicher spielt hierbei der von HENNIG (22) angegebene Plasmafaktor eine Rolle, allerdings nicht als für die Inhibitorwirkung obligat, sondern fakultativ. Von den untersuchten Proteolytica und ihren Vorstufen werden nur Trypsin und Trypsinogen in ausreichendem Maße von ACS und AMCHA gehemmt, nicht aber α -Chymotrypsin und α -Chymotrypsinogen. Es dürften aber alle 4 Substanzen mit den Inhibitoren reagieren, nur eben in der Art, daß α -Chymotrypsin und seine Vorstufe nicht an einer "lebenswichtigen" Stelle getroffen werden, während das bei Trypsin und seinem Vorläufer der Fall ist. Bei Aktivierungsversuchen reagiert der Inhibitor nach dem Massenwirkungs-

gesetz fast ausschließlich mit dem zu aktivierenden Ausgangsstoff und fast nicht mit dem nur in Spuren vorhandenen Katalysator. So erklärt sich, daß α -Chymotrypsinogen unter der Katalyse von Trypsin, trotz Anwesenheit von Inhibitoren, aktiviert wird, obwohl Trypsin an sich blockiert wird. Diese Deutung entspricht in etwa der von AUERSWALD und DOLESCHEL (8), wenn auch die Einzelbefunde dieser Autoren nicht bestätigt werden konnten.

Scheinbar im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen die Befunde, die mit α -Chymotrypsin CHOAY erhoben werden konnten. Diese Ergebnisse dürften aber darauf beruhen, daß dieses Praeparat nicht genügend gereinigt ist, sondern noch Spuren von Trypsin und α -Chymotrypsinogen enthält. Bei einer Incubation wird das Chymotrypsinogen aktiviert und ergibt eine zusätzliche tryptische Aktivität, die aber durch Zugabe von Inhibitoren blockiert werden kann. Es wird also eine Hemmung der Gesamtaktivität des α -Chymotrypsin CHOAY vorgetauscht, während in Wirklichkeit nur Reste nicht aktivierter Vorstufen nicht in die aktive Stufe umgewandelt werden können.

Auffällig erscheint weiterhin die Tatsache, daß der Inhibitoreffekt von verhältnismäßig niederen Dosen ausgelöst wird, während höhere Dosen diesen Effekt nicht mehr ergeben. Erst bei maximalen Dosen ist wieder ein anwachsender Effekt zu verzeichnen.

Eine Erklärung für diesen Befund konnte nicht gefunden werden. Es wäre möglich, daß bei Zugabe steigender Mengen Inhibitor ein Antiinhibitor gebildet wird, der den Inhibitoreffekt verhindert. Bei Zugabe maximaler Mengen Inhibitor wird die Antiinhibitorbildung insuffizient, der Inhibitor kommt wieder zum Tragen. Ein Vergleich der quantitativen Inhibitorwirksamkeit von AMCHA und ACS ist nur für den einzelnen Test, nicht aber generell möglich. Aber auch innerhalb der einzelnen Tests wird ein derartiger Vergleich durch die Tatsache erschwert, daß AMCHA in höheren Dosen einen größeren Wirkungszuwachs besitzt als ACS. Eine 27-fache Wirkung der AMCHA gegenüber der ACS, wie sie OKAMOTO und OKAMOTO (42) im

Plasmatetest ermittelt haben, konnte ich allerdings nicht feststellen. Bei vorsichtiger Wertung ist nach meinen Ergebnissen AMCHA im schlechtesten Fall 2 - 4 mal so wirksam, wie ACS (mit Ausnahme des vorgestellten Fibrinogenolysetestes, bei dem AMCHA, wie schon erwähnt, völlig wirkungslos ist). Das stimmt gut mit den Ergebnissen von MELANDER u. a. (36) überein, die angeben, daß in den bislang verwendeten Praeparaten von AMCHA ein Gemisch von etwa 10 - 25% antifibrinolytisch wirksamem und etwa 75 - 90% antifibrinolytisch inaktivem Isomer der Substanz vorliegt. Dem aktiven Isomer kommt eine 20-fache Wirkung zu, den herkömmlichen Isomerengemischen also eine 2 - 5-fache Aktivität gegenüber der ACS.

In der Verweildauer unterscheiden sich die beiden Inhibitoren nicht wesentlich, was auch nicht zu erwarten war, da beide Inhibitoren - an das Plasmin gebunden - mit diesem ausgeschieden werden dürften.

Die etwas längere Verweildauer des Mischinhibitors gegenüber den reinen Inhibitoren kann dosisbedingt sein. Mit Sicherheit läßt sich aber nach fortgesetzter Applikation eine gewisse Verlängerung der Verweildauer - wahrscheinlich durch Gewebsabsättigung - feststellen. Für eine Akkumulation war der Effekt zu wenig ausgeprägt.

In therapeutischer Hinsicht erscheint als Ergebnis wichtig:

- 1) Das von mir verwendete Isomerengemisch von AMCHA wirkt als Antifibrinolyticum 2 - 4 mal besser als ACS, hat aber grundsätzlich den gleichen Wirkungsmechanismus.
- 2) AMCHA hemmt - neben der Entstehung von Plasmin - auch fertiges Plasmin in seinen fibrinolytischen Eigenschaften. Weiterhin hemmt es im Fibrinogenolysetest Trypsin.
- 3) AMCHA hemmt die Fibrinogenolyse durch Plasmin nicht, was es für eine Fibrinogenkonservierung in vivo untauglich macht.

Z u s a m m e n f a s s u n g :

Es wurden Untersuchungen über die Wirkung dreier Inhibitoren der Fibrinolyse und Proteolyse (Trasylol, ACS und AMCHA) angestellt. Sie wurden in vivo, in vitro und im Thrombelastogramm durchgeführt. Alle Angaben über AMCHA beziehen sich auf das mir vorliegende Praeparat Hi 2108, das 10 - 25 % wirksames Isomer enthielt. Es konnte folgendes festgestellt werden:

- 1) Trasylol hemmt die Aktion des Plasmins und die Plasminentstehung in allen Fibrinolyse - und Fibrinogenolysetests in vitro und in vivo.
- 2) Das verwendete AMCHA-präparat und ACS besitzen einen anderen Wirkungsmechanismus als Trasylol.
- 3) Beide besitzen in vitro antifibrinolytische Eigenschaften, das verwendete AMCHA-präparat wirkt aber im Gegensatz zur ACS in den verwandten Testsystemen nicht antifibrinogenolytisch.
- 4) Das verwendete AMCHA-präparat ist als Inhibitor von Schweineplasmin mindestens 2 - 4 mal wirksamer als ACS.
- 5) Das verwendete AMCHA-präparat zeigt zusammen mit Trasylol eine stärkere Superadditionswirkung als ACS mit Trasylol.
- 6) Das verwendete AMCHA-präparat und ACS hemmen die Aktivierung von α -Chymotrypsinogen durch Trypsin nicht, wohl aber die von Trypsinogen durch α -Chymotrypsin.
- 7) Das verwendete AMCHA-präparat und ACS hemmen im Fibrinogenolyse-test die proteolytischen Eigenschaften von Trypsin, nicht aber von α -Chymotrypsin.
- 8) Im Tierversuch zeigt das verwendete AMCHA-präparat eine Inhibitorwirksamkeit gegenüber der SK-induzierten Hyperfibrinolyse. Die Verweildauer in vasis gleicht derjenigen der ACS.

L i t e r a t u r :

- 1) Astrup, T.: "Neuere Ergebnisse in der Fibrinolyse"
1. Internat. Tgg. Thromb. Embol. Basel
1954
- 2) Astrup, T.: "Neuere Aspekte in der Blutgerinnung
und der Fibrinolyse und ihren Bezie-
hungen zur Coronarthrombose und Co-
ronarsclerose"
Wiener Z^{ts}chr. Innere Med. 39 1958
- 3) Astrup, T.: "Fibrinolyse und Thrombolyse"
1. Internat. Tgg. Thromb. Embol. Basel
1954
- 4) Astrup, T. u. Alkjaersig, N.: "Prüfung von proteolytischen Enzymen
vermittels ihrer fibrinolytischen Aktivi-
tät"
Arch. Biochem. Biophys. 37 99 1952
- 5) Astrup, T. u. Permin, M.: "Fibrinokinase und fibrinolytische Enzyme"
Nature 161 689 1948
- 6) Astrup, T. u. Stage, A.: "Die Isolierung eines löslichen fibrino-
lytischen Aktivators aus tierischem Ge-
webe"
Nature 170 929 1952
- 7) Astrup, T. u. Sterndorff, I.: "Die fibrinolytische Aktivität von Gewebs-
extrakten und Trypsin"
Nature 170 981 1952
- 8) Auerswald, W. u. Doleschel, W.:
"Über den Einfluß von ACS auf die Akti-
vierung von Chymotrypsinogen durch
Trypsin"
Wiener Med. W^{ts}chr. 1962 619
- 9) Benzer, H., Blümel, G., Gottlob, R. u. Piza, F.:
"Die Behandlung von Thrombosen durch
die lokale Infusion fibrinolytischer Fer-
mente - experimentelle Untersuchungen"
Ref. Bd. 80. Dtsch. Chir. Kongr. 1963 No. 111
- 10) Bierstedt, P.: "Körpergewebe als Quelle fibrinolytischer
Aktivität des Blutes und anderer Körper-
flüssigkeiten"
1. Internat. Tgg. Thromb. Embol. Basel
1954

- 11) Bumm, H. - W. u. Welte, W.: "Die Erfassung und Behandlung der acuten autodigestiven tryptischen Pancreatitis"
Landarzt 38 143 1962
- 12) Crawford, T. u. Levence, C. L.: "Die Einlagerung von Fibrin in die Aorten-intima"
Journ. Path. Bact. 64 523 1952
- 13) Crolle, G. u. Marx, R.: "Ricerche di metodologia sul controllo della terapia fibrinolitica con streptochinasi"
Rassegna di Fisiopat. Clin. e Ter. 34 17 1962
- 14) Duguid, J. B.: "Die Thrombose als ein Faktor in der Pathogenese der Coronaratherosclerose"
Journ. Path. Bact. 58 207 1946
- 15) Duguid, J. B. u. Anderson, G. S.: "Die Pathogenese der hyalinen Atherosclerose"
Journ. Path. Bact. 64 519 1952
- 16) Egli, H.: "Physiologische Grundlagen der Fibrinolyse"
V. Hamburger Sympos. über Blutgerinnung 1962, Schattauer Verlag Stutgt. 1962
pag. 5 ff.
- 17) Fischbacher, W.: "Beitrag zur Fibrinolyse"
Med. Diss. Zürich 1960
- 18) Fukutake, K., Shida, K., Arakawa, T. u. Kato, T.: "Analyse der Fibrinolyse vermittels der ACS - vorläufiger Bericht"
Blood 15 690 1960
- 19) Halse, Th.: "Fibrinolyse - experimentelle Studie über die 4. Phase der Blutgerinnung"
Verlag Cantor GmbH Freiburg/Brs.
- 20) Hartert, W.: Dtsch. Arch. Klin. Med. 199 284 1952
- 21) Hartert, W.: Klin. W^ochr. 27 789 1949
- 22) Hennig, K.: "Experimentaluntersuchungen der fibrinolysehemmenden Wirkung der ACS und Organinhibitoren"
Med. Diss. München 1962

- 23) Heuson, I. C. , Peers, W. u. Tagnon, H. L. :
"Ein neuer Zusammenhang zwischen
Fibrinolyse und Haemorrhagien in der
Diagnostik und Therapie"
Blood 13 874 1958
- 24) Karlson, P. :
"Kurzes Lehrbuch der Biochemie"
Thieme-Verlag Stuttgt. 1961
- 25) Koller, F. :
"Fibrinolyse"
Schweizer Med. W^ochr. 90 1233 1960
- 26) Kowalski, M. , Kopek, M. , Latallo, Z. , Roszkowski, S. u. Sendys, N. :
"Über das Vorkommen von plasminogen-
ähnlichen Substanzen im menschlichen
Gewebe"
Blood 13 436 1958
- 27) Kugel, E. :
"Ein Beitrag zum Problem der fibrino-
lytischen Nachblutungen in der Thorax-
chirurgie"
Ref. Bd. 81. Dtsch. Chir. Congr. 1964 No. 93
- 28) Lenkenfeld, F. :
"Über die Parallelität des autodigestiven
Fermentprozesses in Pancreas und Pa-
rotis und deren Behandlung mit Trasylol"
Ther. d. Gegenwart 101 364 1962
- 29) Lewis, J. H. u. Ferguson, J. H. :
"Studien über ein proteolytisches Enzym-
system des Blutes - IV: Aktivierung von
Profibrinolysin durch Serumfibrinolyso-
kinase"
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78 184 1951
- 30) Lohmann, K. , Markwardt, E. u. Landmann, H. :
"Über neue Hemmstoffe der Fibrinolyse"
Naturwiss. 50 1963
- 31) Lohmann, K. , Markwardt, E. u. Landmann, H. :
"Zusammenhang zwischen Konstitution
und Wirkung bei Hemmstoffen der Fi-
brinolyse"
Thromb. Diath. Haemorrhag. 10 425 1964
- 32) Markgraf, W. :
"Beobachtungen über Fibrinolyse in der
Chirurgie, ihre Prophylaxe und gezielte
Behandlung mit Inhibitoren"
Brun's Beitr. Klin. Chir. 205 121 1962

- 33) Markwardt, F. u. Perlewitz, J.:
"Die Hemmung der fibrinolytischen Wirkung von Gewebekulturen durch Antifibrinolytica"
Naturwiss. 50 502 1963
- 34) Marx, R.:
"Wirkungsweise der Fibrinolytica und Antifibrinolytica"
V. Hamburger Sympos. über Blutgerinnung 1962
Schattauer-Verlag Stgtg. 1962 pag. 27 ff.
- 35) Marx, R., Clemente, P., Werle, E. u. Appel, W.:
"Zum Problem eines Antidots in der inter-
nen Thrombotherapie mit Fibrinolytica"
Blut 5 367 1959
- 36) Melander, B., Gliniecki, G., Granstrand, B. u. Hanshoff, G.:
"Amikapron - The Antifibrinolytically Active Isomer of AMCHA"
Report No.: 343
X. Congr. Intern. Soc. of Haematology
Stockholm 1964
- 37) Müller, E.:
"Pathologische Anatomie der Coronarthrombose unter bes. Berücksichtigung der Coronarsclerose und der Atheromatose"
Verh. Dtsch. Ges. f. Kreislaufforsch. 21 3 1955
- 38) Müllertz, S.:
"Ein Plasminogenaktivator im spontan-
aktiven menschlichen Blut"
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 82 291 1953
- 39) Müllertz, S.:
"Komponenten, die in die Bildung eines Plasminogenaktivators im Blut eingreifen"
1. Internat. Tgg. Thromb. Embol. Basel 1955 pag. 75 f.
- 40) Müllertz, S.:
"Das Plasminogenaktivatorsystem im Humanblut"
1. Internat. Tgg. Thromb. Embol. Basel 1955 pag. 79 ff.
- 41) Müllertz, S. u. Lassen, M.:
"Ein Aktivatorsystem im Blut, das zur Bildung von Plasmin durch Streptokinase unentbehrlich ist"
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 82 264 1953

- 42) de Nicola, P., Soardi, F. u. Gibelli, A.:
"Die antifibrinolytische Wirkung der ACS"
Schweizer Med. W^h schr. 90 1256 1960
- 43) Okamoto, S. u. Okamoto, U.: "Amino-Methyl-Cyclohexane-Carboxylic-Acid: AMCHA, A New Potent Inhibitor of the Fibrinolysis"
Keio Journ. Med. 11 105 1962
- 44) Oshiba, S. u. Okamoto, S.: "Influence of AMCHA in the Activity of Fibrinolysin (Plasmin)"
Keio. Journ. Med. 11 117 1962
- 45) Pálos, L. A.: "Atmung, Kreislauf und Gerinnung als funktionelle Einheit"
1. Internat. Tgg. Thromb. Embol. Basel 1955 pag. 54 ff.
- 46) Pechet, L. u. Alexander, B.: "Der Effekt gewisser proteolytischer Enzyme auf die Fibrinogen-Thrombinreaktion"
Biochemistry 1 875 1962
- 47) Ratnoff, O. D.: "Studien über ein proteolytisches Enzym im Humanplasma - IX Fibrinogen und Fibrin als Substrate für das proteolytische Enzym des Plasmas"
Journ. Clin. Invest. 32 473 1953
- 48) Romeis, B.: "Handbuch der mikroskopischen Technik"
Oldenburg Verlag, München 1960
- 49) Schmutzler, R. u. Beck, E.: "Die Wirkung von ACS und Trasylol auf die Fibrinolyse"
Schweizer Med. W^h schr. 92 1368 1962
- 50) Schulz, F. H.: "Fibrinogen und Fibrinolyse beim Myocardinfarkt"
Verh. Dtsch. Ges. f. Kreislaufforsch. 1955 144
- 51) Stacher, A.: ["Zur Wirkung der ACS"
Wiener klin. W^h schr. 74 771 1962
- 52) Steichele, D. F. u. Herschlein, H. J.: "Klinik und Therapie der durch Fibrinolyse und Fibrinogenolyse hervorgerufenen Blutungen"
Med. Welt 1962 141
- 53) Stirnemann, H. u. Büchler, L.: "Neue Erkenntnisse über das Defibrinierungssyndrom"
Klin. W^h schr. 39 1280 1961

- 54) Sträßle, R.: "Antifibrinolyse"
Schweizer Med. W^ochr. 90 1249 1960
- 55) Stüttgen, C., Beckmann, W. u. Tietz-Olschowski, M.:
Klin. W^ochr. 40 1206 1962
- 56) Studer, A.: "Zur Problematik der Tierversuche in der
Arterioscleroseforschung"
Schweizer Med. W^ochr. 92 647 1962
- 57) Thomas, K., Stadler, K. u. Stegemann, H.:
"Stoffwechselversuche mit ACS"
Hoppe Seyler's Z^ochr. physiol. Chem.
317 276 1959
- 58) Werle, E. u. Appel, W.: "Isolierung eines natürlichen Inaktivators
für Kallikrein und einige Proteinase aus
Rinderleber"
Naturwiss. 45 60 1958
- 59) Werle, E. u. Trautscholt, I.: Hoppe Seyler's Z^ochr. physiol. Chem.
325 48 1961

Herrn Prof. Dr. R. Marx möchte ich einmal für die freundliche Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, zum anderen aber für seine wertvollen Anregungen und seine großzügige Unterstützung bei der Planung, der Durchführung und der Auswertung der Versuche sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. H. Schwiegk danke ich für die Übernahme des Co-Referates.

Lebenslauf

Am 7. 9. 1939 wurde ich, Eberhard Schlindwein, als zweiter Sohn des damaligen Amtsgerichtsrates Dr. Karl Schlindwein und seiner Ehefrau Berta, geb. Frammelsberger, in München geboren.

Nach vierjährigem Volksschulbesuch in München-Pasing trat ich 1949 in das Humanistische Gymnasium München-Pasing ein. 1953 wechselte ich an das Ludwigsgymnasium in München über, an dem ich auch 1959 das Reifezeugnis erwarb.

Mein gesamtes medizinisches Studium absolvierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Hier legte ich im April 1962 die ärztliche Vorprüfung und im Juni 1965 die ärztliche Prüfung ab.

